

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



## TESIS DOCTORAL

**Taumatinas y  $\beta$ -1,3-glucanasas: dos familias de proteínas de defensa de plantas implicadas en procesos alérgicos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Torres Cabañuz**

Directores  
Mayte Villalba Díaz  
Oscar Palomares Gracia  
Rosalía Rodríguez García

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



# Taumatinas y $\beta$ -1,3-glucanasas: dos familias de proteínas de defensa de plantas implicadas en procesos alérgicos

---

**Tesis Doctoral**

**María Torres Cabañuz**

**Dirigida por Mayte Villalba, Óscar  
Palomares y Rosalía Rodríguez**

***Madrid 2014***

# ÍNDICE/Index

---

SUMMARY/Resumen .....	1
ABREVIATURAS/Abbreviations .....	7
INTRODUCCIÓN/Introduction .....	11
1. REACCIÓN ALÉRGICA .....	11
1.1. Hipersensibilidad inmediata de tipo I: sensibilización y provocación .....	12
1.2. Factores que influyen en el desarrollo de la atopia .....	14
2. VÍAS DE ACCESO DEL ALÉRGENO .....	17
3. ALERGIA OCUPACIONAL .....	19
4. POLINOSIS .....	21
4.1. El polen .....	21
4.2. Polinosis en el área mediterránea: alergia al polen de olivo como principal exponente.....	23
4.3. Polinosis en Europa Central y del Norte: fresno y Fagales .....	25
5. ALÉRGENOS .....	27
6. REACTIVIDAD CRUZADA .....	30
6.1. Familias alérgicas relevantes en reactividad cruzada.....	31
6.2. Reactividad cruzada de alérgenos de polen de olivo con alérgenos de otros vegetales.....	33
7. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS EN PLANTAS .....	34
7.1. Familia de proteínas de defensa PR-2: $\beta$ -1,3-glucanasas .....	35
7.2. Familia de proteínas de defensa PR-5: TLPs .....	39
8. ALÉRGENOS RECOMBINANTES .....	43
8.1. Producción de proteínas recombinantes: sistemas de expresión.....	43
9. DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DE LA ALERGIA.....	46
9.1. Diagnóstico .....	46
9.2. Terapia.....	48
10. OBJECTIVES/Objetivos .....	51

MATERIALES Y MÉTODOS/Materials and methods .....	55
1. PURIFICACIÓN DE LA TAUMATINA DE ACEITUNA .....	55
1.1. MATERIALES.....	55
1.1.1. Aceitunas .....	55
1.1.2. Soluciones de uso general .....	55
1.2. MÉTODOS .....	55
1.2.1. Preparación de extracto proteico de aceituna .....	55
1.2.2. Purificación de Ole e 13 de carne de aceituna .....	56
1.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) .....	56
1.2.4. Maceración de las aceitunas crudas con sosa.....	57
2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.....	57
2.1. MATERIALES.....	57
2.1.1. Microorganismos.....	57
2.1.2. Vectores plasmídicos.....	58
2.1.3. Medios de cultivo .....	58
2.1.4. Soluciones de uso general .....	58
2.2. MÉTODOS .....	59
2.2.1. Aislamiento de RNA.....	59
2.2.2. Síntesis de cDNA.....	60
2.2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos .....	60
2.2.4. Amplificación de DNA por PCR .....	60
2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	63
2.2.6. Aislamiento y clonación de fragmentos de DNA.....	63
2.2.7. Aislamiento de DNA plasmídico .....	64
3. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LA LEVADURA <i>P. pastoris</i> .....	64
3.1. MATERIALES.....	64
3.1.1. Microorganismos.....	64

3.1.2. Vectores plasmídicos para la expresión de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> .....	65
3.1.3. Medios de cultivo .....	65
3.2. MÉTODOS .....	66
3.2.1. Ligación de fragmentos de DNA en pPICZ $\alpha$ A y transformación de células competentes DH5 $\alpha$ .....	66
3.2.2. Transformación de células KM71 .....	66
3.2.3. Expresión de proteínas recombinantes en células KM71 .....	67
3.2.4. Purificación de proteínas recombinantes producidas en células KM71 ..	67
4. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. coli</i> .....	68
4.1. MATERIALES.....	68
4.1.1. Microorganismos .....	68
4.1.2. Vectores plasmídicos para la expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i> .....	68
4.1.3. Medios de cultivo .....	68
4.2. MÉTODOS .....	69
4.2.1. Ligación de fragmentos de DNA en pET11b y transformación de células BL21-Gold(DE3) .....	69
4.2.2. Expresión de proteínas recombinantes producidas en células BL21-Gold(DE3).....	69
4.2.3. Purificación de proteínas recombinantes producidas en células BL21-Gold(DE3).....	70
5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS .....	70
5.1. MATERIALES.....	70
5.1.1. Pólenes .....	70
5.1.2. Alimentos de origen vegetal.....	71
5.1.3. Soluciones de uso general .....	71
5.2. MÉTODOS .....	71
5.2.1. Preparación de extractos proteicos.....	71
5.2.2. Transferencia electroforética .....	72

5.2.3. Electroforesis bidimensional .....	72
5.2.4. Detección de azúcares.....	73
5.2.5. Espectrometría de masas y secuenciación de proteínas.....	73
5.2.6. Determinación de características moleculares y búsquedas de homología de secuencia .....	74
<b>6. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>75</b>
6.1. MÉTODOS .....	75
6.1.1. Espectros de absorción ultravioleta .....	75
6.1.2. Cálculo del coeficiente de extinción .....	75
6.1.3. Análisis espectroscópico por dicroísmo circular.....	75
6.1.4. Curvas de desnaturalización térmica.....	76
<b>7. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>77</b>
7.1. MATERIALES.....	77
7.1.1. Microorganismos.....	77
7.1.2. Reactivos.....	77
PDA: medio de patata/dextrosa/agar. ....	77
7.2. MÉTODOS .....	78
7.2.1. Actividad antifúngica .....	78
7.2.2. Actividad enzimática $\beta$ -1,3-glucanasa .....	78
7.2.3. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y electroforesis en geles de afinidad (AGE) en presencia de carbohidratos.....	79
<b>8. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>79</b>
8.1. MATERIALES.....	79
8.1.1. Sueros .....	79
8.1.2. Anticuerpos.....	80
8.2. MÉTODOS .....	81
8.2.1. Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto .....	81
8.2.2. Ensayos de inhibición .....	81

8.2.3. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa .....	82
PRIMERA PARTE. Taumatina natural y recombinante de aceituna: alergia ocupacional e implicación en reactividad cruzada.....	87
1. AISLAMIENTO DE LA TLP DE ACEITUNA Y ESTUDIO DE SU IMPLICACIÓN EN LA ALERGIA OCUPACIONAL.....	88
2. PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DE rOle e 13 .....	95
2.1. Clonación y secuenciación del DNA codificante de Ole e 13.....	95
2.2. Comparación de la secuencia de Ole e 13 con la de otras TLPs homólogas ..	97
2.3. Producción recombinante de Ole e 13 en la levadura <i>Pichia pastoris</i> .....	99
2.4. Purificación de rOle e 13 .....	100
2.5. Caracterización molecular de rOle e 13 .....	102
2.6. Caracterización espectroscópica .....	105
2.7. Predicción de estructura secundaria .....	106
3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE rOle e 13 .....	107
3.1. Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa.....	108
3.2. Actividad antifúngica .....	109
4. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE rOle e 13.....	111
4.1. Presencia de proteínas homólogas a Ole e 13 en diversos alimentos de origen vegetal .....	112
4.2. Reactividad cruzada de Ole e 13 con otras TLPs a nivel de IgE .....	113
4.3. Predicción teórica de epítopos IgE de Ole e 13 .....	117
PRIMERA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL.....	120
SEGUNDO APARTADO. $\beta$ -1,3-glucanasas, una familia heterogénea de proteínas con capacidad alergénica. Estudio de su estructura, función y alergenicidad .....	126
1. IDENTIFICACIÓN, PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DE LA $\beta$ -1,3-GLUCANASA DEL POLEN DE FRESNO.....	128
1.1. Detección de una $\beta$ -1,3-glucanasa en polen de fresno .....	128

1.2.	Clonación y secuenciación de Fra e 9, una $\beta$ -1,3-glucanasa del polen de fresno .....	129
1.3.	Fra e 9 pertenece a una familia de proteínas homólogas .....	131
1.4.	Expresión recombinante de NtD-Fra e 9 y CtD-Fra e 9.....	134
1.4.1.	Expresión y purificación de rNtD-Fra e 9.....	134
1.4.2.	Expresión y purificación de rCtD-Fra e 9 .....	137
1.5.	Caracterización de rNtD-Fra e 9 y rCtD-Fra e 9 .....	138
1.5.1.	Caracterización molecular .....	138
1.5.2.	Caracterización espectroscópica .....	142
1.5.3.	Predicción de estructura secundaria .....	143
2.	ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE rNtD Y rCtD DE Fra e 9 .....	146
2.1.	Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa del dominio catalítico de Fra e 9.....	146
2.2.	Actividad antifúngica de rNtD-Fra e 9 .....	147
2.3.	Unión de rCtD-Fra e 9 a carbohidratos.....	148
3.	CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE rNtD Y rCtD de Fra e 9.....	153
3.1.	Titulación del anticuerpo policlonal específico de cada uno de los dominios de Fra e 9 .....	153
3.2.	Epítotos IgG e IgE de Fra e 9 están presentes en los extractos de polen de fresno y olivo .....	154
3.3.	Reactividad cruzada entre polen de fresno y olivo a través de los dominios recombinantes de las $\beta$ -1,3-glucanasas Fra e 9 y Ole e 9.....	156
3.3.1.	Estudio de la reactividad cruzada entre el dominio N-terminal de Fra e 9 y el de Ole e 9 .....	157
3.3.2.	Estudio de la reactividad cruzada entre los dominios C-terminal de Fra e 9 y de Ole e 9. Implicación del alérgeno Ole e 10 .....	160
4.	REACTIVIDAD CRUZADA DE Fra e 9 Y Ole e 9 CON $\beta$ -1,3-GLUCANASAS PRESENTES EN EXTRACTOS PROTEICOS DE PÓLENES Y ALIMENTOS VEGETALES ....	165
4.1.	Epítotos IgG comunes a Fra e 9 y Ole e 9 en otras glucanasas de origen vegetal .....	165
4.2.	Epítotos IgE comunes a Fra e 9 y Ole e 9 en otras glucanasas de origen vegetal .....	167



SEGUNDA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL.....	169
CONCLUSIONES GENERALES/General conclusions .....	177
BIBLIOGRAFÍA/Bibliography .....	181



## SUMMARY/Resumen

---

Type I hypersensitivity is a disorder characterized by raised IgE antibody levels to antigens in the environment that are harmless for most people (the so-called allergens). The main clinical manifestations of allergic diseases encompass asthma; rhinitis; atopic dermatitis; drug, food, and insect food allergy, and anaphylaxis. The prevalence of allergic diseases has dramatically increased in both developed and developing countries over the last decades. According to World Health Organization (WHO) statistics, hundreds of millions of subjects in the world suffer from rhinitis and it is estimated that 300 million have asthma, markedly affecting the quality of life of these individuals and their families, and negatively impacting the socio-economic welfare of society. The precise causes of such increment in the prevalence of allergic diseases are not fully understood yet. Allergy should be recognized as a public health problem and efforts should be made towards its prevention, diagnosis and optimal treatment.

The optimization of patient care requires a detailed study of the patient's history; analysis of the possible environmental exposure factors; and the performance of proper diagnostic *in vivo* and *in vitro* tests. Although diagnostic testing is never a substitute for an exhaustive examination of the patient's symptoms and medical history, the absence of an accurate diagnosis can result in multiple complications or inappropriate treatment. Once there are sufficient clinical grounds to support a diagnosis of allergy, confirmatory *in vivo* and *in vitro* tests are indicated for the identification of the causative allergens. To assess this purpose, skin tests should use standardized allergen extracts and/or relevant purified allergens, implying a deep study of the allergens contained in the implicated allergenic sources.

Olive tree (*Olea europaea*) pollen is one of the most important allergenic sources in Mediterranean countries and some areas of America, South Africa, Japan and Australia. In some areas of Spain and Italy, where olive tree is extensively

cultivated, olive pollen can be the first cause of pollinosis. The olive tree belongs to the *Oleaceae* family which also includes ash (*Fraxinus* L.), privet (*Ligustrum* L.), lilac (*Syringa* L.), forsythia (*Forsythia* L.), and jasmine (*Jasminum* L.) genus, some of them being also reported as allergenic sources. The allergogram of olive pollen is very complex and up to date twelve allergens -Ole e 1 to Ole e 12- have been identified and characterized. Most of them have been cloned and produced as recombinant proteins. The availability of these purified allergens have allowed the analysis of their three-dimensional structure, the mapping of their T-cell and B-cell epitopes, as well as the determination of the precise patients' pattern of sensitization [Rodríguez y col., 2001; Villalba y col., 2013]. While olive pollen displays high allergenicity, in olive fruit only one allergen, the thamatin-like protein (TLP) Ole e 13, has been identified so far [Palomares y col., 2008].

Among *Oleaceae*, ash pollen is also a significant allergy inducer in central Europe and clinicians are paying attention to the study of its allergenic content [Hrabina y col., 2007]. Thus far, Fra e 1 [Barderas y col., 2005] -the main ash pollen allergen- has been the only allergen characterized from ash pollen. Along this work development, there have been identified in ash pollen the 8 most prevalent olive pollen homolog allergens -Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 10, Fra e 11 y Fra e 12- and except Fra e 7 and Fra e 9, all of them have been sequenced and cloned [Mas y col., 2014].

In this work, two allergenic protein families, TLPs and the  $\beta$ -1,3-glucanases, have been explored in detail. Both protein families belong to the pathogenesis-related (PR) protein superfamily and they are clasified as relevant allergenic protein families [Radauer y col., 2006].

The plant TLPs belong to the PR-5 family. They are important food and pollen allergens and constitute the 7<sup>th</sup> most prevalent allergenic protein family in food allergy. There are evidences of their implication in pollen and vegetable food cross-

reactivity [Wagner y col., 2004]. As it was mentioned before, the allergenic TLP Ole e 13 has been found in row olives. Besides the presence of this TLP in raw olives and its role as an inhalant allergen in occupational asthma [Palomares y col., 2008], it appears unlikely to cause food allergy. This fact is due to the degradation of Ole e 13 and the consequent lost of the IgE epitopes that occurs during the olive fruit maceration [Torres y col., 2014]. A high aminoacidic sequence identity has been shown with TLPs from kiwi (68%), banana (67%) and bell pepper (67%), belonging to the *Rosaceae* family the ones with less sequence identity.

In this study, Ole e 13 has been produced as a recombinant protein in the yeast *Pichia pastoris* and characterized from structural and immunological point of view. The spectroscopic analysis of rOle e 13 showed a secondary structure according to other members of this protein family [Leone y col., 2006; Ghosh y col., 2008]. A specific antibody of nOle e 13 and a serum of an allergic patient to olive [Palomares y col., 2008] have been used to detect common IgG and IgE epitopes within other plant TLPs. The reactivity observed with these antiserums in the kiwi, bell pepper and banana extracts, perfectly fit with the high identity/similarity values of the amino acidic sequence of these TLPs with Ole e 13. Cross-reactivity has not been detected with peach, cherry, apple, or in pollens, including those of cypress and juniper. Our results demonstrate that Ole e 13 might well display cross-reactivity with TLPs from banana, kiwi, bell pepper or avocado, but not with TLPs of *Rosaceae*, thus supporting the previously published data [Palacín y col., 2012] that shows the absence of significant co-sensitization of Ole e 13 with TLPs from other vegetables and pollens, in a population of allergic patients to *Rosaceae* family fruits. This cross-reactivity via Ole e 13 could affect those patients sensitized to olive by inhalation who bring into contact with one of the previously mentioned allergenic sources.

Antifungal capacity has been described for some of the allergenic TLPs [Menu-Bouaouiche y col., 2003] but the molecular mechanisms remain elusive. Purified Ole e 13 did not show antifungal activity against *Fusarium oxysporum*,

*Aspergillus niger*, *A. ochraceus* and *A. flavus*, but we cannot rule out the possible activity of Ole e 13 against other fungi.

The olive fruit and its oil are being increasingly introduced into the diet and used in the cosmetic industry due to its hydrating and nourishing properties. Therefore, it is important to consider the potential capacity of such products to develop allergies [Malmkvist Padoan y col., 1990; Wong y col., 2004]. The knowledge of the structural and immunological characteristics of the Ole e 13 might be particularly useful for the diagnosis of those patients who could be sensitized to raw olive fruit as a primary sensitizer agent, or through cross-reactivity with TLPs from other allergenic sources. Besides Ole e 13 - the only allergen described in olive fruit so far - some other IgE-reactive proteins have been detected in the liposoluble fraction [Álvarez-Eire y col., 2012]. None of them have been identified and its allergenicity could persist after the maceration, so there might be an interest to see in detail the allergenic profile of this liposoluble fraction and its possible impact in the allergy field.

In the present study we also provide novel insights into the knowledge of allergenic  $\beta$ -1,3-glucanases.  $\beta$ -1,3-glucanases constitute an ubiquitous family of evolutionary related proteins widely distributed among higher plants, fungi and bacteria. The biochemical activity of these enzymes is based on the hydrolytic cleavage of 1,3-D-glucosidic linkages in  $\beta$ -1,3-glucans, which are major structural components of the cell wall surrounding fungi and plants.

The allergenic activity of  $\beta$ -1,3-glucanases has not been studied in depth. From the few described as allergenic, only Hev b 2 from latex [Alenius y col., 1995], Mus a 5 from banana [Peumans y col., 2000] and Ole e 9 from olive pollen [Huecas y col., 2001; Palomares y col., 2003; Palomares y col., 2005] have been properly studied. The fact that  $\beta$ -1,3-glucanases are distributed widely in superior plants, being some of them allergenic, attaches great importance to them as a matter for examination of the allergic processes.

Herein, we demonstrate that the  $\beta$ -1,3-glucanase from ash (*Fraxinus excelsior*) pollen, Fra e 9, is a new allergenic member of the family 17 of plant glycosyl hydrolases. This allergenic enzyme consists of a long polypeptide chain with a catalytic N-terminal domain and a C-terminal moiety able to bind carbohydrates. Despite the phylogenetic proximity to Ole e 9, its homologous counterpart from olive pollen, there is only a 39% identity between their aminoacidic sequences. We analysed the structural and functional properties of this enzyme and compare them to those of Ole e 9. For such purpose, both independent domains of Fra e 9 have been produced as recombinant proteins and deeply characterized and compared to their corresponding homologous recombinant domains of Ole e 9.

Although a low or null enzymatic activity has been associated to long  $\beta$ -1,3-glucanases, the recombinant N-terminal domain of Fra e 9 displays 200-fold higher *in vitro* hydrolytic activity on laminarin, a  $\beta$ -1,3-glucan, than Ole e 9. In contrast, the C-terminal domain of Fra e 9 possesses 35 times lower affinity to laminarin than Ole e 9 as determined by affinity gel electrophoresis. Fra e 9 also shows affinity to the  $\beta$ -1,3/1,4-glucan lichenan. These data support that the cysteine-rich C-terminal domain could play a role in the regulation of the catalytic activity by approaching polysaccharides to the proximities of the catalytic site facilitating the substrate hydrolysis [Guillén y col., 2010].

Specific rabbit antisera raised against rNtD and rCtD of Fra e 9 were assayed with ash and olive pollen extracts in 2D-electrophoresis. Although several isoforms with pI ranging between 4.8 and 9.0 were detected in both pollen extracts with the rNtD antiserum, ash pollen showed a higher concentration of basic isoforms. The main spots recognized with the rCtD antiserum were present in both extracts. We compare the IgE-inhibition capability of ash and olive allergens from pollen extracts when rNtD and rCtD of Fra e 9 were immunostained with a pool of Ole e 9-allergic. In both cases a 100% inhibition was reached with the maximum extract concentrations used. Thus  $\beta$ -1,3-glucanases from both extracts share IgE epitopes.

We also show that despite the structural and functional differences between Fra e 9 and Ole e 9, both molecules retain comparable IgE-binding capacity when assayed with sera from olive pollen allergic patients. Our detailed structural and functional comparison between these two closely related enzymes provides novel insights into the complexity and relevance of  $\beta$ -1,3-glucanases, suggesting that this protein family might display significant intrinsic allergenic properties. rNtD and rCtD of Fra e 9 are likely to be allergenic proteins that could be used in the diagnosis of patients allergic to ash pollen. rNtD-Fra e 9 contains IgE epitopes not present in rNtD-Ole e 9 but recognized by olive pollen allergic patients, which could be also useful to improve the diagnosis of these patients. The potential clinical relevance of ash pollen  $\beta$ -1,3-glucanases is further enhanced by the fact that i) the *Oleaceae* family is an important allergenic source, being Ole e 9 a major allergen in certain regions of the south of Spain, ii) ash pollinosis is relevant in some european countries and iii) cross-reactivity among *Oleaceae* family allergens is reported [Rodríguez y col., 2001; Batanero y col., 2010; Villalba y col., 2013].

Fra e 9 also shares IgE epitopes with other glucanases present in different vegetable food and pollen extracts. This contrast with results published for rNtD-Ole e 9, being banana, kiwi and pear the ones more cross-reactive with rNtD-Fra e 9, while in rNtD-Ole e 9 the principal cross-reactivity is intended principally to tomato, bell-pepper and potato. This broadens the potential targets of  $\beta$ -1,3-glucanase cross-reactive allergenic sources.

In summary, the results from this study provide a relevant knowledge in the field of allergenic TLPs and  $\beta$ -1,3-glucanases that can be used to improve the allergy diagnosis and treatment.



## ABREVIATURAS/Abbreviations

---

**AGE:** electroforesis de afinidad en gel

**APC:** célula presentadora de antígeno

**βME:** beta-mercaptoetanol

**BMGY:** medio complejo de glicerol tamponado

**BMMY:** medio complejo de metanol tamponado

**BSA:** seroalbúmina bovina

**CCDs:** determinantes de carbohidratos de reactividad cruzada

**CHAPS:** 3-[(3-Colamidopropil) dimetilamonio]-1- propano sulfonato

**CtD:** dominio C-terminal

**ConA:** concanavalina A

**CD:** dicroísmo circular

**DAB:** 3,3'-diaminobenzidina-HCl

**DCs:** células dendríticas

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DO:** densidad óptica

**DTT:** ditioneitol

**dNTPs:** mezcla equimolar de los cuatro desoxirribonucleótidos

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas

**EPIT:** inmunoterapia epicutánea

**FcεRI:** receptor de alta afinidad del fragmento Fc de IgE

**GAR-HRP:** anticuerpo de cabra frente a IgG de conejo conjugado con peroxidasa

**GHF:** familia de glicosil hidrolasas

**HLA:** antígenos de histocompatibilidad de leucocitos humanos

**Ig:** inmunoglobulina

**IL:** interleuquina

**ILIT:** inmunoterapia intralinfática

**IPTG:** isopropiltiogalactósido

**LB:** medio de cultivo Luria-Bertani

**LTPs:** proteínas transferidoras de lípidos

**MALDI-TOF:** desorción ionización láser asistida por matriz-tiempo de vuelo

**MHC:** complejo principal de histocompatibilidad

**MOPS:** ácido 3-(N-morfolin) propano sulfónico

**NtD:** dominio N-terminal

**OIT:** inmunoterapia oral

**OPD:** o-fenilendiamina

**PAGE-SDS:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS

**PBS:** tampón fosfato salino

**PMSF:** fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PRs:** proteínas relacionadas con patogénesis

**RAM-HRP:** anticuerpo de conejo frente a IgG de ratón conjugado con peroxidasa

**RAST:** prueba de radioalergoadsorción

**RMN:** resonancia magnetic nuclear

**RP-HPLC:** cromatografía líquida de

**SCIT:** inmunoterapia subcutánea

**SLIT:** inmunoterapia sublingual

**TBP:** tributilfosfina

**TBS:** tampón Tris salino

**TFA:** ácido trifluoroacético

**Th:** células T colaboradoras

**TLPs:** proteínas tipo taumatina

**Tm:** temperatura de fusión

**TAE:** tampón Tri-acetato

**TE:** tris-EDTA buffer

# **INTRODUCCIÓN**

## **Introduction**



---

# INTRODUCCIÓN/Introduction

---

## 1. REACCIÓN ALÉRGICA

El término **alergia** (del griego *allos* y *ergon*, “reacción extraña”) fue introducido en 1906 por Clemens Freiherr von Pirquet, que reconoció que en la inmunidad protectora y en las reacciones de hipersensibilidad, los antígenos inducían cambios en la reactividad mediada por el sistema inmune. El término **atopia** lo introdujo Fernández-Coca en 1923 para describir a aquellos individuos con predisposición genética a desarrollar enfermedades alérgicas. La alergia o **hipersensibilidad inmediata de tipo I** es una reacción iniciada por mecanismos inmunológicos, y mediada por anticuerpos y células. El anticuerpo responsable de una reacción alérgica pertenece a las inmunoglobulinas (Ig) de tipo E. Las reacciones de **hipersensibilidad de tipo II** son reacciones citotóxicas entre el antígeno unido a células y los anticuerpos circulantes IgM o IgG. En la alergia no mediada por IgE, el anticuerpo puede pertenecer al isotipo IgG, como por ejemplo, en la anafilaxia producida por inmunocomplejos que contienen dextranos, y en la anafilaxia clásica, denominada enfermedad del suero, previamente descrita como una reacción de **tipo III**. La **hipersensibilidad de tipo IV** es una reacción inmune celular mediada por linfocitos que reaccionan con células que contienen el antígeno a través de citoquinas.

La **atopia** es la tendencia personal y/o familiar, generalmente manifestada en la niñez o adolescencia, a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a sustancias comunes, generalmente proteínas, denominadas **alérgenos**. Como consecuencia de dicha exposición, estos sujetos pueden desarrollar síntomas típicos como asma, rinoconjuntivitis, eczema, dermatitis o afecciones gastrointestinales. Los

términos atopia y atópico se deben reservar para describir la predisposición genética a sensibilizarse a alérgenos presentes en el medio ambiente a los que está todo el mundo expuesto, aunque la mayoría no produce una respuesta IgE prolongada. El término atopia no puede ser usado hasta que la sensibilización a IgE haya sido comprobada bien por la detección de anticuerpos IgE en suero o bien por un resultado positivo en prueba cutánea.

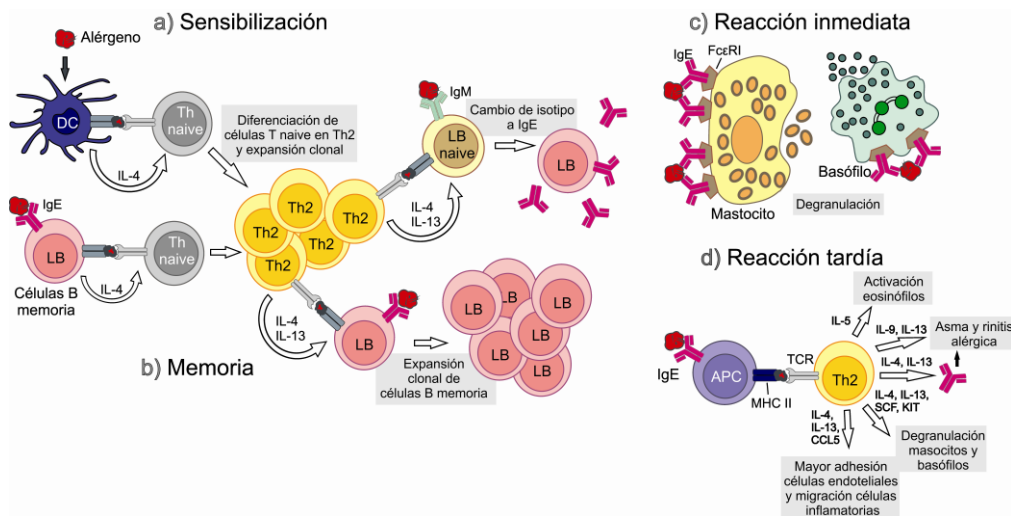
Los procesos alérgicos representan un problema global de salud que se ha ido agravando en las últimas décadas, incrementándose tanto en prevalencia como en severidad de síntomas, e influyendo en ello de manera decisiva diversos factores ambientales como son la polución o el acceso a nuevos alimentos. Actualmente, en determinados países europeos, hasta un 50% de los niños tiene una sensibilización mediada por IgE a alérgenos alimentarios o inhalantes [Bousquet y col., 2011] y más del 25% de la población mundial está afectada por esta hipersensibilidad.

### **1.1. Hipersensibilidad inmediata de tipo I: sensibilización y provocación**

Aunque algunos aspectos de las bases moleculares y celulares de la alergia no se conocen todavía con exactitud, los acontecimientos que en ella se desarrollan se pueden dividir en dos etapas (FIG. 1):

**Etapas de sensibilización y memoria:** En esta etapa los antígenos entran en contacto con el organismo a través de piel y mucosas (respiratoria o gastrointestinal) y son captados en compartimentos vesiculares y procesados enzimáticamente en vesículas endosómicas/lisosómicas de las células presentadoras de antígeno (APC; células de Langerhans, macrófagos, células B o células dendríticas) dando lugar a péptidos que van a ser presentados en la superficie celular mediante su acoplamiento a las moléculas de clase II (MHC-II o HLA-II en humanos). Estos complejos estables se distribuyen en la superficie de las APC, donde se presentan a los linfocitos T naive CD4<sup>+</sup> promoviendo la diferenciación de éstos a células colaboradoras de tipo 2 (Th2). Las Th2 estimulan el cambio de isotipo de la inmunoglobulina asociada a los linfocitos B

principalmente mediante la secreción de interleuquina 4 (IL-4) y otras como IL-13 [Minton, 2008], induciendo la activación y diferenciación de éstos a células productoras de IgE específicas de alérgenos. Las IgE producidas pasan a la circulación y se unen a receptores de IgE de alta afinidad presentes en células granulocíticas, mastocitos y basófilos, receptores específicos de cadenas pesadas  $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RI). Además, el individuo queda provisto de un remanente de células T y B específicas de memoria que responderán ante exposiciones posteriores al alérgeno.



**FIGURA 1. Esquema del mecanismo celular de la alergia.** Etapas de sensibilización (a), memoria (b) y de provocación, dividida en fase inmediata (c) y tardía (d). DC: célula dendrítica; Th: linfocito T colaborador; LB: linfocito B; APC: célula presentadora de antígeno; MHC-II: complejo mayor de histocompatibilidad II; TCR: receptor de células T. Adaptado de [Larché y col., 2006].

**Etapas de provocación:** Tras una reexposición al alérgeno, éste va a entrar en contacto con las IgE específicas de la membrana de las células efectoras. La unión del antígeno va a provocar el entrecruzamiento de las moléculas de IgE ancladas a los Fc $\epsilon$ RI, desencadenando la activación de los mastocitos y basófilos. Dicha activación se traduce en tres tipos de respuestas biológicas: i) Secreción por exocitosis del contenido preformado de los gránulos del interior de las células, tales como histamina,

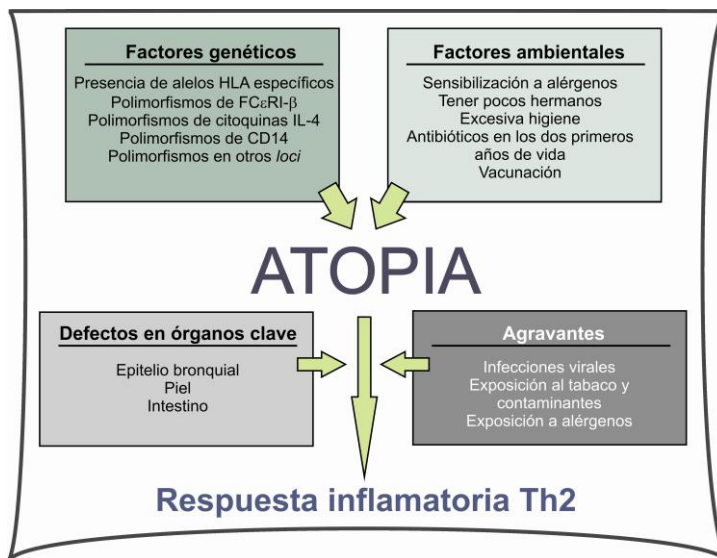
heparina, proteasas, etc.; ii) síntesis y secreción de mediadores lipídicos derivados de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática; y iii) síntesis y secreción de citoquinas. La acción de estos mediadores sobre diversos tejidos es responsable de la sintomatología asociada a la alergia: rinitis, asma bronquial, conjuntivitis, urticaria, eczema, dermatitis atópica y trastornos gastrointestinales. A esta *fase temprana*, puede seguir una reacción de *fase tardía* provocada por la acumulación de leucocitos inflamatorios, tales como neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos Th2, ya que la desgranulación de mastocitos puede causar la inducción de moléculas de adhesión en las células endoteliales de los vasos y atraer a dichos leucocitos hacia los tejidos. La respuesta tardía puede ocurrir sin una reacción de hipersensibilidad inmediata previa, como ocurre por ejemplo en el asma bronquial o el eczema, y en estos casos las citoquinas que inducen la reacción tardía proceden de los linfocitos Th2.

Hay otras poblaciones de células T efectoras CD4<sup>+</sup>, como las Th1, Th9, Th17 o Th22, que pueden intervenir en enfermedades alérgicas [Akkoc y col., 2011]. Las células Th1 median reacciones inflamatorias [Akkoc y col., 2008]. Las células Th9 podrían estar implicadas en inmunidad frente a patógenos así como regular procesos de inflamación alérgica y autoinmune, y de inmunidad antitumoral [Veldhoen y col., 2008; Kaplan, 2013]. Las células Th17 contribuyen a la diferenciación y activación de células Th2 específicas de antígeno, así como al flujo de eosinófilos hacia los órganos diana, mientras que las células Th22 regulan procesos de inmunidad epitelial en enfermedades inflamatorias de la piel como psoriasis, eczema atópico o dermatitis de contacto [Eyerich y col., 2009].

## 1.2. Factores que influyen en el desarrollo de la atopia

La alergia es una enfermedad multifactorial, que viene determinada tanto por **factores intrínsecos** (factores genéticos, edad, sexo) (1) como **extrínsecos** (factores ambientales) (2) y cuya manifestación está condicionada por la afectación de los órganos diana, así como por la presencia de agentes agravantes (3) (FIG. 2).





**FIGURA 2.** Factores que influyen en el desarrollo de la atopia y la alergia inflamatoria mediada por células Th2. Adaptado de [Kay, 2001].

1. Las enfermedades alérgicas tienen un **componente genético** importante. Debido a la complejidad de los procesos alérgicos se han utilizado diversas técnicas para la identificación de marcadores genéticos relevantes en alergia y asma. Estos abordajes consisten principalmente en la *identificación de polimorfismos en genes candidatos* a estar implicados en el proceso alérgico y en la *clonación posicional*, que permite relacionar la herencia de una región cromosómica específica con la adquisición de la enfermedad. Estos análisis han conseguido vincular determinados *loci* a la atopia, pero se sigue sin tener resultados de su asociación con la relevancia clínica en los pacientes.

Algunos ejemplos de los avances obtenidos con estas estrategias han permitido relacionar el haplotipo HLA-II de determinados individuos con la respuesta a alérgenos purificados, como es el caso de un alelo del locus HLA-DR y la reactividad al alérgeno Amb 5 de ambrosía (*Ambrosia* spp.) [Marsh y col., 1982] o el de la respuesta

alérgica a Ole e 1 y los haplotipos DR7 y DQ2 [Cárdaba y col., 1996]. Se han descrito 33 genes susceptibles de presentar una asociación con fenotipos asmáticos, cuya relación ha sido establecida tanto por análisis de polimorfismos en genes candidatos como por *clonaje posicional*. Esos genes están implicados en procesos de inmunidad innata e inmunorregulación (CD14, TGFB1), síntesis de IgE (IL-13, IL-4), inflamación alérgica (TBX21, GATA3, STAT6) y genes expresados en células epiteliales implicados en hiperreactividad (CCL5, CCL11, CCL24 y CCL26) [Vercelli, 2008]. Gracias al clonaje posicional se han relacionado ciertos *loci* de los cromosomas 2q, 5q, 6q, 11q, 12q, y 13q con el asma y la atopía.

2. La predisposición genética por sí sola no puede explicar la elevada prevalencia de las enfermedades alérgicas de las últimas décadas, que asciende a un 30% de la población en países industrializados. Los **factores ambientales** son claves en el desarrollo de la alergia, así como de enfermedades autoinmunes mediadas por Th1. Se ha propuesto que, debido a la higiene excesiva y a la disminución de la exposición a agentes microbianos por el creciente uso de antibióticos, la actividad de las células Treg se ha visto desajustada, provocando un incremento de las respuestas Th1 y Th2 [Palomares y col., 2010].

3. El desarrollo de respuestas inflamatorias mediadas por células Th2 se ve incrementada por **defectos en los órganos diana** y por **agravantes** como infecciones virales o la exposición a agentes contaminantes ambientales. Determinadas enfermedades alérgicas como el asma, pueden alterar los mecanismos inmunorreguladores y provocar daño en las mucosas, lo cual puede verse agravado por la exposición a alérgenos, tabaco, infecciones virales o contaminantes atmosféricos [Vernon y col., 2012]. Los contaminantes atmosféricos no solamente tienen un efecto directo o indirecto sobre el individuo sino que tienen una importante acción sobre los aeroalérgenos, incrementando su expresión [Bartra y col., 2007].

## 2. VÍAS DE ACCESO DEL ALÉRGENO

Los alérgenos, dependiendo de la fuente biológica de la que procedan, van a acceder al organismo preferencialmente a través de una vía concreta. La vía de acceso es un criterio en función del cual pueden clasificarse los alérgenos (TABLA 1).

TABLA 1. Clasificación de alérgenos en función de su vía de acceso al organismo

Vía de acceso	Fuente biológica		Alérgenos
RESPIRATORIA	Pólenes	Árboles <i>Betula berrucosa</i> (abedul) <i>Fraxinus excelsior</i> (fresno) <i>Olea europaea</i> (olivo)	Bet v 1-7 Fra e 1-3, 6-9 y 10-12 Ole e 1-12
		Arbustos <i>Ambrosia artemisiifolia</i> (ambrosía) <i>Artemisia vulgaris</i> (artemisia) <i>Salsola kali</i> (barrilla borde)	Amb a 1, 3-10, CPI Art v 1-6, Art v TLP Sal k 1-5
		Gramíneas <i>Lolium perenne</i> (ballico) <i>Phleum pratense</i> (hierba timotea)	Lol p 1-5, 7 y 10-13 Phl p 1-7 y 11-13
	Ácaros	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Der p 1-3, 5-8, 10, 11, 14, 15, 18, 21
		<i>Dermatophagoides farinae</i>	Der f 1-11, 13-18, 20-22
	Alimentos	Harinas de cereales (trigo) Molturados (aceituna)	Tri a TLP, gliadinas Ole e 13
	Epitelios	<i>Cannis familiaris</i> (perro) <i>Felis domesticus</i> (gato)	Can f 1-6, 8 Fel d 1-8
	Hongos y levaduras	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Alt a 1-13, 70 kDa, TCTP Asp f 1-13, 15-18, 22, 23
	Insectos	<i>Blatella germanica</i> (cucaracha)	Bla g 1, 2, 4-8
	Alimentos	Frutas (manzana, melón) Frutos secos (cacahuete) Huevo Leche Legumbres (soja) Marisco (gamba) Pescado (bacalao) Semillas (mostaza amarilla)	Mal d 1-4, Cuc m 1-3 Ara h 1-11 Ovalbúmina, ovomucoide Caseínas, $\beta$ -lactoglobulina Gly m 1-7, CPI, EAP, TI Tropomiosina (Pen a 1) Parvalbúmina (Gad m 1) Sin a 1-4
INYECTABLE	Veneno de insectos	<i>Apis mellifera</i> (abeja) <i>Vespula vulgaris</i> (avispa)	Api m 1-10, 12, 13 kDa Ves v 1-3, 5, 6
CONTACTO	Látex	<i>Hevea brasiliensis</i> (látex)	Hev b 1-14

Los alérgenos que acceden por **vía aérea** (aeroalérgenos) pueden ser tanto *alérgenos de interior* como *alérgenos de exterior*. Los primeros se caracterizan por ser perennes y los más importantes son de origen animal, que en los países desarrollados occidentales proceden de ácaros: Der p 1 y Der p 2 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) [Lombardero y col., 1990; Bessot y col., 2011]; de gato: Fel d 1 (*Felis domesticus*) [Kelly y col., 2012]; o de cucaracha cuyo principal alérgeno es Bla g 2 (*Blatella germanica*) [Helm y col., 1993; Arruda y col., 2001]. El grupo de alérgenos de exterior se caracteriza por su estacionalidad, y son relevantes los alérgenos de pólenes, incluyendo Bet v 1 de abedul (*Betula verrucosa*) [Ipsen y col., 1983; Hauser y col., 2011]; Ole e 1 de olivo (*Olea europaea*) [Villalba y col., 1994; Barber y col., 2008]; Lol p 11 [van Ree y col., 1995] (*Lolium perenne*); y Phl p 1 y Phl p 5 de hierba timotea (*Phleum pratense*) [Schenk y col., 1995; van Ree y col., 1998]. Los alérgenos de ambrosía Amb a 1, 2, 3, 5 y 6 (*Ambrosia artemisiifolia*) [Wopfner y col., 2005] y artemisia Art v 1-4 (*Artemisia vulgaris*) [Wopfner y col., 2005; Mohapatra y col., 2008] son alérgenos estacionales importantes en Norte América y Europa, respectivamente.

A diferencia de los aeroalérgenos, que llegan estructuralmente íntegros a las mucosas donde ejercen su acción, los alérgenos que entran en contacto con el individuo por **ingestión**, pueden llegar a sufrir importantes modificaciones antes de entrar en contacto con el sistema inmunitario, tanto por el procesamiento del propio alimento (tratamientos térmicos como el tostado, freído o ebullición, o tratamientos como la alta presión, extrusión o ultrasonido) y su preparación (envasado, aditivos, etc.) como por la acción química y enzimática que tiene lugar durante la digestión del mismo. Estos procesos pueden alterar significativamente las características estructurales de los alérgenos y así disminuir o incrementar su alergenicidad. A pesar de ello, en general, los alérgenos alimentarios se caracterizan por poseer una gran estabilidad frente al calor, pH extremos y proteasas. Entre un 3 y un 8% de la población sufre alergia alimentaria, siendo mayor la incidencia en niños. A pesar del elevado número de alérgenos, estos se agrupan en muy pocas familias proteicas.

Destacan como fuentes alergénicas más frecuentes las proteínas de la leche (caseínas y  $\beta$ -galactoglobulinas) [Docena y col., 1996; Sackesen y col., 2011]; el pescado (parvalbúminas como Gad c 1 de bacalao) [Elsayed y col., 1971]; el marisco (las tropomiosinas como Pen a 1) [Shanti y col., 1993; Lopata y col., 2009], el huevo (la ovalbúmina Gal d 2) [Bleumink y col., 1969]; los frutos secos (como Ara h 1-3 de cacahuete) [Burks y col., 1991; Burks y col., 1992; Rabjohn y col., 1999; Boulay y col., 2008]; y frutas (proteínas transferidoras de lípidos, LTP, del inglés “Lipid Transfer Proteins”, como Pru p 3 de melocotón [Sánchez-Monge y col., 1999; Palacín y col., 2012] entre otras .

Los alérgenos que acceden por **vía inyectable** son aquellos procedentes del veneno de insectos -siendo los más comunes de avispas y abejas- o de la administración de antibióticos como la penicilina o ciertas vacunas. Las reacciones a alérgenos inyectables son menos comunes que otros tipos de reacciones alérgicas, pero son más susceptibles de provocar anafilaxia a los individuos que las padecen.

En la alergia **por contacto**, el látex (*Hevea brasiliensis*) es una de las fuentes alergénicas más relevantes, especialmente en el sector de los trabajadores de la salud. Puede ocasionar hipersensibilidad de tipo I con sintomatología como rinoconjuntivitis, eczema, urticaria y asma, así como hipersensibilidad de tipo IV [Gawchik, 2011].

### 3. ALERGIA OCUPACIONAL

La exposición a partículas procedentes de material orgánico (plantas, animales, hongos, bacterias), agentes químicos, o animales en el puesto de trabajo, puede causar el desarrollo de diversos tipos de respuestas alérgicas, a las que se engloba con la terminología de alergia ocupacional.

La historia clínica normalmente proporciona información que asocia la sintomatología con el lugar de trabajo, interrumpiéndose dichos síntomas durante los fines de semana o los periodos vacacionales. No obstante las reacciones, en muchas ocasiones, se llegan a prolongar durante los días no laborables. Por ello es importante el diagnóstico precoz de este tipo de alergias, ya que, de lo contrario, la sintomatología podría persistir de forma crónica indefinidamente, siendo la causa de numerosas bajas laborales.

En función de la sintomatología podemos distinguir distintos tipos de alergia ocupacional. Los principales tipos de alergia ocupacional, de los cuales se citan algunos ejemplos ilustrativos, son: el asma ocupacional, que puede tener lugar por la inhalación de harinas [Quirce y col., 2006], del molturado de aceituna [Palomares y col., 2008] o por el procesamiento de mariscos [Lopata y col., 2013], entre otros; la rinitis alérgica ocupacional por la inhalación del polvo de determinadas maderas como la del obeche [Aranda y col., 2013] o inducido por manipulación de determinados alimentos [Sastre y col., 2013] o del manejo de alérgenos en un laboratorio de investigación [Palomares y col., 2008]; la dermatitis de contacto ocupacional por látex en el caso del personal sanitario [Al-Niaimi y col., 2013], a causa de productos utilizados por los trabajadores del sector de la limpieza [Bauer, 2013], o por manipulación de alimentos [Mur Gimeno y col., 2013]; la urticaria ocupacional por la manipulación de alimentos como mariscos [Pala y col., 2012], por la utilización de guantes de polivinilo [Sasseville y col., 2012]; el eczema ocupacional en personal sanitario [Visser y col., 2013] y en peluqueros [Hougaard y col., 2012]; y la anafilaxia ocupacional [Willi y col., 2009; Kim y col., 2010].

## 4. POLINOSIS

La polinosis o alergia a pólenes, es la inflamación de la mucosa nasal y/o conjuntival y/o bronquial causada por alérgenos contenidos en los granos de polen. Se produce a través de un mecanismo inmunológico mediado por IgE. Tiene gran relevancia clínica por tratarse, junto con los ácaros del polvo, de la alergia más frecuente. Las manifestaciones clínicas clásicas las constituyen los ataques de rinitis y conjuntivitis alérgica, siendo también frecuente la aparición de asma. La incidencia de la polinosis está muy condicionada por los factores ambientales, principalmente los que caracterizan la zona fitogeográfica, así como por las características del polen, ya que, a pesar de haber más de 250000 plantas productoras de polen, menos de 100 son las que hasta la fecha se han descrito como causantes de alergia.

Las gramíneas como el ballico (*Lolium perenne*), la hierba timotea (*Phleum pratense*), o malezas como la artemisa, pueden encontrarse en cualquier parte de Europa, y de hecho en prácticamente todo el mundo, de ahí su importancia en la polinosis. Algunas plantas se encuentran solo en regiones concretas, como ocurre con árboles como el abedul (*Betula verrucosa*, *Betula pendula*) o el fresno (*Fraxinus excelsior*, *Fraxinus angustifolia*), distribuidos en el norte de Europa, o el olivo en las zonas mediterráneas; arbustos como la ambrosia (*Ambrosia artemisifolia*) que predomina en América del Norte; o malezas como la parietaria (*Parietaria judaica*) en regiones húmedas y litorales.

### 4.1. El polen

La disciplina que estudia el polen y las esporas se denomina **palinología**. Los granos de **polen** (FIG. 3) son las células sexuales masculinas de las plantas con flores, se forman en el interior de los estambres y una vez maduros son liberados de las anteras. En algunas especies, plantas *autógamas*, el polen puede fecundar a las flores

de la misma planta que lo ha formado, pero la mayor parte de las especies son *alógamas*, es decir, su polinización es cruzada, dándose la fecundación entre individuos genéticamente diferentes de la misma especie. El traslado del polen desde los sacos polínicos de las anteras hasta el micrópilo de los óvulos en Gimnospermas o el estigma en Angiospermas, se conoce como **polinización**. Los casos más frecuentes de polinización son por anemofilia, mediante la cual, al ser los granos de polen de pequeño tamaño, el viento actúa como mejor agente diseminador; y por entomofilia, cuando son los insectos los que se encargan de la polinización. Las flores zoófilas deben poseer productos atractivos (cebos, como el polen y el néctar), medios de reclamo (olores y colores) y, además, tener un polen viscoso o adherente para facilitar el transporte por los insectos.



**FIGURA 3.** Microscopía electrónica de transmisión de granos de polen de fresno.

En la mayoría de las plantas superiores, la polinización se inicia cuando el grano de polen parcialmente desecado entra en contacto con el estigma, éste le aporta agua y el grano se hidrata mediante un mecanismo extremadamente controlado, que se completa cuando el polen adquiere forma redondeada. A continuación, el polen sufre un proceso de activación que se caracteriza por una reorganización citoplasmática en la que se forma un gradiente de calcio, siendo este gradiente crítico para la polarización del tubo polínico y la deposición de calosa (polisacárido  $\beta$ -1,3-glucano) en uno de los tres poros (el polen es tricolporado) del que emergerá el tubo polínico. El crecimiento del tubo polínico ocurre mediante la



generación de un flujo de vesículas derivadas del Golgi que contienen los precursores de la pared del tubo, y que se mantiene gracias a la síntesis, degradación y ensamblaje continuo del citoesqueleto [Kroeger y col., 2012]. El proceso de polinización requiere que los granos de polen sean especialmente resistentes para hacer frente a la adversidad de las condiciones ambientales. Es por ello que el polen está recubierto por una pared externa dura denominada **exina**, cuyo principal componente es un politerpeno impermeable y resistente a los agentes químicos, denominado esporopolenina. Cada grano de polen contiene en su interior células vegetativas (no reproductivas) y una célula generativa (reproductora) implicada en la formación de las gámetas masculinas.

#### **4.2. Polinosis en el área mediterránea: alergia al polen de olivo como principal exponente**

Los suelos, y especialmente la vegetación de la Región Biogeográfica Mediterránea, son muy diversos. La vegetación mediterránea europea oscila desde los bosques caducifolios hasta los yermos semidesérticos. No obstante, en su mayor parte, la cobertura vegetal se encuentra dominada por árboles y arbustos de hoja perenne, así como por un elevado número de especies herbáceas de fenología primaveral, y en menor medida otoñal. Las penínsulas Ibérica y Balcánica, en comparación con cualquiera de las otras regiones de Europa, poseen un elevado número de especies fanerógamas autóctonas y una enorme cantidad de endemismos. En cuanto a su relevancia alérgica, destacan especies como las pertenecientes a las familias de las gramíneas, oleáceas, cupresáceas, y quenopodiáceas.

La familia *Oleaceae* comprende 24 géneros de plantas leñosas, incluidos arbustos, árboles y trepadoras. El polen más alérgico es el producido por la especie *Olea europaea*, que constituye una de las principales causas de alergia respiratoria en el área mediterránea y la segunda causa de polinosis en España. La polinosis de olivo está asociada a polisensibilización -a varias especies distintas- y produce escasas

monosensibilizaciones -a una especie- entre los pacientes, afectando principalmente a adultos, aunque la sensibilización a polen de olivo se da también en niños.

El olivo es una especie rústica distribuida preferentemente en zonas de clima mediterráneo, aunque se ha introducido en zonas de América, Australia, Japón y el sur de África donde se dan condiciones climatológicas similares a las del Mediterráneo. Su polinización tiene lugar de mediados de abril a finales de junio. La concentración atmosférica media de polen de olivo en áreas con cultivos de esta especie varía entre 100 y 200 granos/m<sup>3</sup>, aunque en áreas de España como Jaén o Córdoba, o Apulia en Italia, se alcanzan habitualmente concentraciones de 3000-4000 granos/m<sup>3</sup>, llegándose a obtener algunos días niveles superiores a los 10000 granos/m<sup>3</sup>. La exposición a elevados niveles de polen de olivo puede provocar que alérgenos minoritarios, como Ole e 9, se conviertan en principales para una población concreta [Rodríguez y col., 2002; Duffort y col., 2006]. Hasta la fecha, se han descrito 12 alérgenos (Ole e 1-12) [Batanero y col., 2010; Villalba y col., 2013].

*Parietaria judaica* es una maleza causante de polinosis, muy frecuente, en el sur de Europa. *P. officinalis* es una especie menos alergénica que se halla en otras zonas de Europa como Croacia. Aunque la polinosis por *Parietaria* es prácticamente exclusiva de la costa mediterránea, en los mapas polínicos se describe este tipo de polen en otras zonas de Europa, donde presumiblemente corresponde a la ortiga, que resulta ser morfológicamente indistinguible de la *Parietaria* pero que no es alergénica.

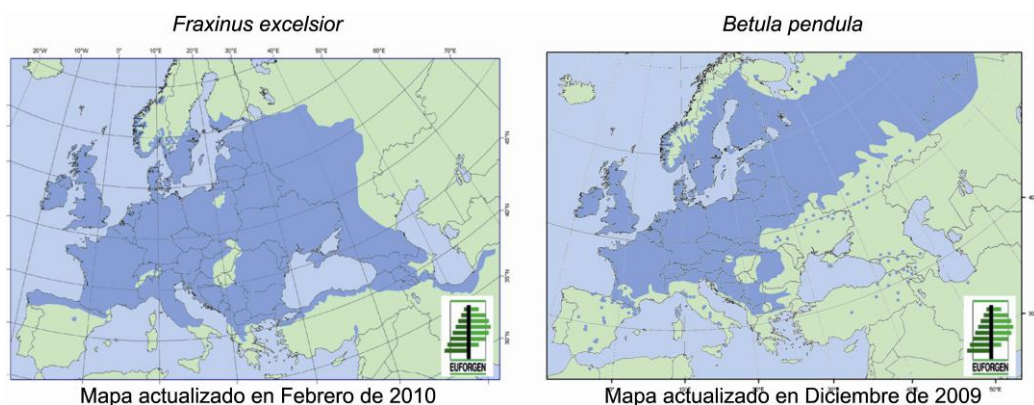
En los últimos años el polen de la familia *Cupressaceae* se ha considerado uno de los principales agentes inductores de alergia inhalados de la región Mediterránea. Las especies más comunes son *Cupressus sempervirens*, *C. arizonica*, *C. macrocarpa* y *C. lusitanica* [Charpin y col., 2005]. La sintomatología predominante es la **rinoconjuntivitis y el asma**. Los pacientes monosensibilizados a ciprés tienen niveles normales de IgE total o incluso por debajo de lo normal en comparación con los pacientes polisensibilizados, y además suelen presentar sintomatología a una edad

más avanzada que el resto de pacientes polínicos de su misma área geográfica [Di Felice y col., 2001].

El polen de *Amaranthaceae*, como el de *Salsola kali* y *Chenopodium album*, plantas típicas de los climas semidesérticos y de los suelos salinos, son una causa importante de alergia en el área mediterránea debido a la creciente desertización que está sufriendo Europa, especialmente los países del sur [Mas y col., 2012]. A diferencia de los alérgicos a gramíneas y olivo, el desarrollo de asma es menos frecuente, debido, entre otros motivos, a que la exposición ambiental es más baja.

#### 4.3. Polinosis en Europa Central y del Norte: fresno y Fagales

En Europa Central y del Norte, donde no hay apenas olivos, sí se encuentran de manera común dos géneros de la familia *Oleaceae*, que son *Fraxinus* y *Ligustrum*, así como la familia *Betulaceae* dentro del orden Fagales (FIG. 4).



**FIGURA 4. Distribución geográfica del fresno y del abedul en Europa.** En azul se indican las zonas donde se encuentran los respectivos géneros. Mapas obtenidos de <http://www.euforgen.org>.

El fresno europeo (*Fraxinus excelsior*) es común en la mayor parte de Europa, incluyendo el norte de España, Islas Británicas, Francia, Europa Central y el sur de Escandinavia [Hemmer y col., 2000]. Es una especie apreciada por su alto valor ecológico así como por su madera. Además, es un árbol de crecimiento rápido y su

distribución natural coincide con la del roble común (*Quercus robur*), característico de bosques europeos. En los bosques del sur de Europa, *F. excelsior* coexiste con *F. angustifolia* y con *F. ornus* [Oxford Forestry Institute. y col., 2005]. El fresno está cada vez más extendido en Europa, probablemente influenciado por el decrecimiento de la población rural [Dobrowolska y col., 2011]. Los suelos fértiles, con pH neutro, profundos y bien drenados favorecen el buen crecimiento de estos árboles. El fresno es responsable de alergias en latitudes templadas donde los niveles de polen pueden alcanzar los 1000 granos/m<sup>3</sup>. Casi el 20% de los pacientes polínicos de estas zonas están sensibilizados al polen de fresno, por lo que debería estar considerado como una fuente alergénica relevante. Sin embargo, su relevancia ha sido eclipsada por el solapamiento de su polinización y su distribución geográfica con la de los abedules, siendo esta la razón por la que el fresno no ha sido incluido en los ensayos diagnósticos de rutina. El polen de fresno es sin embargo hoy en día responsable de polinosis en zonas como Alsacia (Francia), Alemania y Suiza, donde es tan frecuente como el polen de abedul. En zonas mediterráneas la mayoría de pacientes alérgicos muestran pruebas cutáneas positivas tanto al polen de fresno como al de olivo probablemente debido a reactividad cruzada entre sus proteínas alergénicas.

Hasta 2013, Fra e 1 [Barderas y col., 2005] -alérgeno principal del polen de fresno- era el único alérgeno caracterizado en polen de fresno. A lo largo del desarrollo de este trabajo se han identificado en en dicho polen 8 alérgenos homólogos a los más prevalentes en polen de olivo -Fra e 2, Fra e 3, Fra e 6, Fra e 7, Fra e 9, Fra e 10, Fra e 11 y Fra e 12- los cuales han sido secuenciados y clonados todos excepto Fra e 7 y Fra e 9. En relación con la prevalencia de estos alérgenos, Fra e 1 presenta la más elevada (> 75%), siendo Fra e 2, Fra e 9 y Fra e 11 también relevantes aunque en menor medida [Mas y col., 2014].

Dentro del orden Fagales, la especie más alergénica es el abedul, siguiéndole en importancia el aliso, el avellano, el castaño y el roble. Bet v 1 es el alérgeno mayoritario de polen de abedul y su cDNA fue uno de los primeros en ser aislado de

una fuente alergénica, y ha sido descrito como marcador de sensibilización a polen de abedul. Al igual que en el caso de los pólenes de Oleáceas, hay un nivel elevado de reactividad cruzada entre las plantas más representativas de este género. En Europa del Este la floración del abedul comienza a finales de marzo, en Europa Central a mediados de abril y en el Norte, en función de la latitud, la floración ocurre desde finales de abril a principios de mayo. El pico de polen, en cada caso, se produce de 1 a 3 semanas después. El avellano y el aliso tienen una polinización más temprana, de diciembre a abril, por lo que actuarían como precursores de la sensibilización al polen de abedul, incrementando la sintomatología clínica durante la polinización del abedul [D'Amato y col., 2007].

## 5. ALÉRGENOS

Los alérgenos, generalmente, son proteínas o glicoproteínas capaces de inducir la producción de anticuerpos IgE específicos en individuos susceptibles de desarrollar enfermedades alérgicas. En ciertas circunstancias, carbohidratos puros han sido considerados alérgenos [Commings y col., 2010; Kennedy y col., 2013]. En raras ocasiones, un producto químico de bajo peso molecular, como los isocianatos y los anhídridos, actúan como haptenos pudiendo, al unirse a una proteína transportadora inmunogénica, constituir un alérgeno para los anticuerpos IgE del individuo alérgico. En el caso de la dermatitis de contacto, los alérgenos clásicos son sustancias químicas de bajo peso molecular como formaldehído e iones metálicos como cromo o níquel, que reaccionan con los linfocitos T.

La interacción entre alérgenos e IgE subyace en enfermedades como rinitis, sinusitis, asma, neumonitis por hipersensibilidad, conjuntivitis, eczema, dermatitis por contacto, etc. Tanto, factores intrínsecos -como predisposición genética, edad o sexo- como factores extrínsecos o ambientales, contribuyen al reconocimiento de estas

proteínas por el sistema inmunitario, desarrollándose un proceso alérgico a través de la alteración de los mecanismos homeostáticos normales de defensa.

La mayoría, si no todas, las proteínas de una determinada fuente son potencialmente alergénicas puesto que no existen claros patrones moleculares que determinen que una molécula sea o no un alérgeno, pero el número de proteínas que reconoce un paciente sensibilizado dependerá de la base genética del individuo, de la complejidad de la fuente, de la accesibilidad y estabilidad de dichas moléculas, así como de la sensibilidad y características de la técnica empleada para determinar la alergenicidad. Los alérgenos procedentes de una determinada fuente cuya frecuencia de reconocimiento es superior al 50% de los pacientes alérgicos a dicha fuente se denominan **alérgenos principales**, y son **secundarios** cuando los reconoce menos del 50%.

Muchos alérgenos poseen actividad bioquímica. Se han estudiado las características fisicoquímicas y bioquímicas de proteínas alergénicas que presentan actividad hidrolítica, función transportadora, estructural, o que actúan como inhibidores enzimáticos, entre otras (TABLA 2), así como la relación de estas actividades enzimáticas con la capacidad inmunogénica de los alérgenos.

Determinadas actividades bioquímicas, como la actividad proteasa o la capacidad de interacción con membranas celulares, se han relacionado con un incremento en la capacidad alergénica, ya que su actuación puede contribuir a aumentar la permeabilidad del epitelio de las vías respiratorias. Esto ocurre con el alérgeno Der p 1 de ácaros (*D. pteronyssinus*), al que se le atribuye la capacidad de promover la síntesis de IgE de manera directa mediante la unión al receptor de baja afinidad CD23 [Gough y col., 1999], así como de inducir el desarrollo de células Th2 [Ghaemmaghami y col., 2002]. Es interesante destacar que muchas de las propiedades bioquímicas descritas en alérgenos están relacionadas con procesos de defensa frente a patógenos.

TABLA 2. Principales funciones bioquímicas descritas en alérgenos

Actividad bioquímica	Alérgenos
<b>TRANSPORTADORAS</b>	
Citocromo C	Cyn d 10, Lol p 10, Poa p 10
Lipocalinas	Bla g 4, Mus m 1, Rat n 2
LTPs	Cor a 8, Mal d 3, Ole e 7, Par j 1, Pru p 3
PR-10	Api g 1, Bet v 1, Cor a 1, Mal d 1, Pruav 1
<b>HIDROLÍTICAS</b>	
<b>Proteasas</b>	
Cisteín-proteasas	Act c 1, Der f 1, Der p 1
Metaloproteasas	Colagenasa (de <i>Clostridium histolyticum</i> )
Serín-proteasas	Der f 3, Der p 3, Der p 6, Der p 9
<b>Glicosidasas</b>	
Amilasas	Aca s 4, Blo t 4, Der p 4
Glucanasas	Hev b 2, Mus a 5, Ole e 9
Pectatoliasas	Cry j 1, Cup a 1, Cup s 1, Amb a 1
Pectinmetilesterasas	Act d 7, Bet v 8, Ole e 11, Sal k 1
Poligalacturonasas	Cha o 2, Cry j 2, Jun a 2
Quitinasas	Cas s 5, Der p 15, Hev b 11, Mus a 2, Pers a 1
<b>Ribonucleasas</b>	Asp f 1, Dac g 5, Lol p 5
<b>INHIBIDORES ENZIMÁTICOS</b>	Act d 6, Ara h 3, Pla a 1, Tri a 15
<b>REGULADORAS</b>	
Proteínas de unión a actina	Ara h 5, Bet v 2, Cor a 2, Fra e 2, Ole e 2, Lol p 12
Proteínas de unión a $\text{Ca}^{2+}$	Bet v 3, Fra e 3, Jun o 4, Ole e 3, Ole e 8, Phl p 7
Tropomiosina	Der f 10, Der p 10
<b>DE RESERVA</b>	
Albúminas 2S	Ara h 2, Bra j 2, Sin a 1
Globulinas 11S	Cor a 9, Pis v 5, Sin a 2
Otras albúminas	Lactalbúmina, ovalbúmina

Los alérgenos poseen determinadas zonas en su estructura que van a ser reconocidas por IgE específicas. Se trata de regiones de 8-15 aminoácidos a las que se denomina **epítomos** o determinantes antigénicos, y a la parte de un anticuerpo que reconoce el epítomo se llama **parátomo**. Hay dos categorías de epítomos en base a su

estructura y a la interacción con el parátipo. Los **epítomos conformacionales** están compuestos por regiones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno, e interaccionan con el parátipo en base a la superficie tridimensional resultante de la estructura terciaria del antígeno. Los **epítomos lineales** interaccionan con el parátipo en base a su estructura primaria y están formados por aminoácidos secuenciales dentro de la cadena polipeptídica del antígeno.

## 6. REACTIVIDAD CRUZADA

La mayoría de pacientes presentan reacciones alérgicas a múltiples fuentes alérgicas. Esta polisensibilización puede deberse a *co-sensibilización*, es decir sensibilización independiente y simultánea a varias fuentes alérgicas, o estar ocasionada por un fenómeno de *reactividad cruzada* [Ferreira y col., 2006].

La *reactividad cruzada* se produce cuando los anticuerpos IgE que se han desarrollado frente a un alérgeno contenido en una fuente alérgica reconocen epítomos comunes en alérgenos homólogos de otras fuentes alérgicas. El contacto con dichas proteínas homólogas contenidas en la fuente no sensibilizante puede desencadenar reacciones alérgicas o resultar irrelevante para el paciente. Los niveles de IgE específica, así como la afinidad de las IgE por el antígeno, son factores importantes, pero lo que va a determinar en mayor medida la reactividad cruzada van a ser las características estructurales de los antígenos a nivel tanto de estructura primaria como terciaria.

En la reactividad cruzada hay una premisa fundamental basada en que una mayor relación filogenética entre organismos alérgicos implica por lo general mayor número de alérgenos compartidos. La presencia de **panalérgenos**, tales como profilinas, LTPs o proteínas relacionadas con patogénesis, son una excepción, ya que se trata de proteínas evolutivamente muy conservadas por desempeñar funciones



vitales para el organismo, presentes en numerosas especies. Un amplio número de casos de reactividad cruzada entre especies no relacionadas está causado por panalérgenos y por los denominados **CCDs** (del inglés “cross-reactive carbohydrate determinants”), es decir, carbohidratos presentes en glicoproteínas que pueden desencadenar reactividad cruzada mediada por IgE, aunque ésta no suela tener relevancia clínica [Altmann, 2007].

Desde una perspectiva clínica, la reactividad cruzada a través de panalérgenos, como las profilinas, supone un problema en la sensibilización a pólenes y alimentos [Hauser y col., 2010]. Los panalérgenos podrían estar implicados en el proceso de expansión intermolecular de epítomos (“inter-molecular epitope spreading”), mecanismo inmunológico por el que el reconocimiento de un determinado epítomo de un antígeno puede dirigir la respuesta inmune a través de otros epítomos.

La reactividad cruzada es especialmente significativa en los pólenes, ya que hay muchas familias asociadas bajo un mismo orden que contienen moléculas con alto grado de identidad.

### 6.1. Familias alergénicas relevantes en reactividad cruzada

Uno de los ejemplos mejor estudiados en reactividad cruzada es la **familia de proteínas homólogas a Bet v 1** [Hauser y col., 2011; Hofmann y col., 2013]. Se trata del principal alérgeno del polen de abedul, que muestra reactividad cruzada con alérgenos de frutas de la familia *Rosaceae* como Mal d 1 de manzana, Pru av 1 de cereza, Pru ar 1 de albaricoque, Pyr c 1 de pera, así como de vegetales de la familia *Apiaceae* entre los que destaca Api g 1 de apio, de frutos secos como Cor a 1.04 de avellana y de legumbres como Ara h 8 de cacahuete. Bet v 6, una isoflavona reductasa, parece también estar implicada en reactividad cruzada con alimentos como pera, lichi o el caqui [Karamloo y col., 2001].

También puede existir reactividad cruzada entre plantas filogenéticamente poco relacionadas, a través principalmente de alérgenos como profilinas, polcalcinas, TLPs (del inglés “thaumatin-like proteins”) y  $\beta$ -1,3-glucanasas en menor medida.

Las **profilinas** son proteínas de pequeño tamaño, 12-15 kDa, presentes en todos los organismos eucariotas. Tienen capacidad de interaccionar con la actina del citoesqueleto y con fosfoinosítidos [Kannan Krishnan y col., 2009]. Están consideradas como *panalérgenos*, debido a su elevada similitud de secuencia y su presencia en multitud de fuentes alérgicas diversas [Barderas y col., 2004; Sirvent y col., 2011; Sirvent y col., 2012].

Las **polcalcinas** constituyen una familia de alérgenos exclusivos de polen y son proteínas ligantes de calcio con dos dominios de tipo *EF-hand*. Se trata de una familia de panalérgenos ampliamente distribuida y con una estructura primaria muy conservada (71–96% similitud, 62–90% identidad) [Ledesma y col., 1998].

La mayoría de las  **$\beta$ -1,3-glucanasas** de origen vegetal son endoglucanasas capaces de hidrolizar polímeros de  $\beta$ -1,3-glucanos. Estas enzimas están presentes en diferentes fuentes alérgicas y se ha descrito su posible implicación en el síndrome látex-frutas, así como en la reactividad cruzada entre polen, frutas y látex [Salcedo y col., 2001; Wagner y col., 2004; Palomares y col., 2005].

Las **TLPs** se han caracterizado como alérgenos tanto en alimentos vegetales, principalmente frutas, como en algunos pólenes y se tienen evidencias de su implicación en la reactividad cruzada entre pólenes y alimentos [Wagner y col., 2004]. Existe una tendencia en el perfil de reconocimiento de TLPs en la que los pacientes que muestran una respuesta de mayor intensidad son aquellos que presentan alergia a frutas, mientras que la respuesta es más frecuente en pacientes que además son polínicos. Sin embargo, los pacientes que solo son polínicos, no presentan ningún patrón de reconocimiento claro [Palacín y col., 2012].

## 6.2. Reactividad cruzada de alérgenos de polen de olivo con alérgenos de otros vegetales

Los pacientes sensibilizados a polen de olivo presentan sintomatología alérgica al estar expuestos a otros pólenes como abedul, pino o artemisia, así como con otros miembros de la familia de las Oleáceas [González y col., 2000].

Ole e 1 es el alérgeno principal del polen de olivo, presentando una prevalencia de más del 75% [Villalba y col., 1993; Rodríguez y col., 2001; Rodríguez y col., 2002; Villalba y col., 2013]. Se trata de una glicoproteína con tres puentes disulfuro. Se han encontrado alérgenos homólogos a Ole e 1 en otros pólenes de Oleáceas, incluyendo Fra e 1 (fresno) con 91% de identidad, Syr v 1 (lila) con 90% y Lig v 1 (aligustre) con 88%, siendo estos alérgenos los máximos responsables de reactividad cruzada entre Oleáceas. Aunque se han detectado homólogos a Ole e 1 en otras familias de plantas como Lol p 11 en *Lolium* [van Ree y col., 1995], Pla l 1 en *Plantago* [Castro y col., 2007] o Che a 1 en *Chenopodium* [Barderas y col., 2002], la reactividad cruzada es baja, probablemente debido a la escasa similitud de secuencia [Barderas y col., 2002].

Además de Ole e 1, hay otros alérgenos de polen de olivo implicados en reactividad cruzada, como son la profilina Ole e 2 y la polcalcina Ole e 3. Ambas familias de alérgenos se encuentran ampliamente conservadas en distintas fuentes biológicas, participando en reactividad cruzada con pólenes de especies relacionadas o no filogenéticamente [Batanero y col., 1996; Ledesma y col., 1998; Barber y col., 2009]. También la  $\beta$ -1,3-glucanasa Ole e 9 [Palomares y col., 2005], la proteína de unión a carbohidratos Ole e 10 [Barral y col., 2004] y la pectín metilesterasa Ole e 11 [Cuesta-Herranz y col., 2010] desempeñan un papel relevante en procesos de reactividad cruzada con otras especies vegetales. Sin embargo, no se ha detectado reactividad cruzada entre la LTP de olivo (Ole e 7) y sus homólogos en alimentos (melocotón, manzana o mostaza) y otros pólenes [Tordesillas y col., 2011; Palacín y col., 2012], a pesar de tratarse de peretenecer a una familia panalérgica.

## 7. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA PATOGÉNESIS EN PLANTAS

Hay multitud de factores ambientales que deterioran el estado fisiológico de las plantas ocasionando cambios en todos los niveles funcionales de los organismos, y por tanto una desviación de las condiciones óptimas para la vida. A esto se le conoce como estrés, y engloba desde el ataque de determinados patógenos, condiciones ambientales adversas, hasta alteraciones a nivel fisiológico y bioquímico. En la estrategia de defensa de las plantas frente a factores de estrés están implicadas una amplia variedad de herramientas, entre las que se incluyen diferentes tipos de proteínas con funciones protectoras. Las proteínas relacionadas con patogénesis, llamadas proteínas de defensa (PR, del inglés “Pathogenesis-Related Proteins”) van a jugar un papel importante en la defensa de plantas frente a la invasión por patógenos y en la adaptación de éstas a ambientes de estrés.

Las PR son proteínas codificadas en el genoma de las plantas y cuya expresión se induce en situaciones de patogénesis o estrés no provocado por patógenos. Sin embargo, hay PRs que se expresan de manera constitutiva. Originalmente se clasificaron en 5 grupos (PR-1 a PR-5), alcanzando en la actualidad un total de 17 familias [van Loon y col., 2006]. Las pertenecientes al grupo PR-1 son las más abundantes, y pueden suponer entre 1-2% del total de proteínas de la hoja; sin embargo, aunque su función biológica es desconocida, se ha atribuido actividad enzimática a los miembros de la mayoría de las 17 familias (TABLA 3). No todas las familias se ven representadas en todas las especies de plantas, y puede haber diferencias en cuanto a sus propiedades e incidencia entre los distintos miembros de una misma familia.

**TABLA 3. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis.** Adaptado de [van Loon y col., 2006]

Familia	Miembro representativo	Función
<b>PR-1</b>	PR-1 de tabaco	Desconocida
<b>PR-2</b>	PR-2 de tabaco	$\beta$ -1,3-glucanasa
<b>PR-3</b>	P, Q de tabaco	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII
<b>PR-4</b>	'R' de tabaco	Quitinasa tipo I, II
<b>PR-5</b>	S de tabaco	Proteínas tipo taumatina (TLPs)
<b>PR-6</b>	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteinasa
<b>PR-7</b>	P <sub>69</sub> de tomate	Endoproteinasa
<b>PR-8</b>	Quitinasa de pepino	Quitinasa tipo III
<b>PR-9</b>	Tabaco "peroxidasa formadora de lignina"	Peroxidasa
<b>PR-10</b>	"PR1" de perejil	Proteínas tipo ribonucleasa
<b>PR-11</b>	Quitinasa "clase V" de tabaco	Quitinasa tipo I
<b>PR-12</b>	Rs-AFP3 de rábano	Defensina
<b>PR-13</b>	THI2.1 de Arabidopsis	Tionina
<b>PR-14</b>	LTP4 de cebada	LTP
<b>PR-15</b>	OxOa (germina) de cebada	Oxalato oxidasa
<b>PR-16</b>	OxOLP de cebada	Oxalato oxidasa-like
<b>PR-17</b>	PRp27 de tabaco	Desconocida

Como ejemplo de alérgenos incluidos dentro del grupo de proteínas de defensa encontramos las  $\beta$ -1,3-glucanasas (PR-2), quitinasas (PR-3; PR-4), proteínas tipo taumatina (TLPs) (PR-5), heveína (PR-8), holmólogos a Bet v 1 (PR-10) o las LTPs (PR-14) que son proteínas implicadas en el transporte de lípidos de los lisosomas a la mitocondria.

### 7.1. Familia de proteínas de defensa PR-2: $\beta$ -1,3-glucanasas

Las enzimas endo- $\beta$ -1,3-glucanasas constituyen una familia de proteínas evolutivamente relacionadas que están ampliamente distribuidas en plantas superiores, hongos y bacterias.

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas superiores pertenecen a la familia 17 de la superfamilia de las enzimas hidrolíticas glicosil-hidrolasas (GHF 17). Estas enzimas están registradas en la base de datos "Carbohydrate-Active Enzymes" (CAZy) (<http://www.cazy.org>) [Cantarel y col., 2009]. En procesos de infección de plantas se induce la expresión de los genes de  $\beta$ -1,3-glucanasas, y al tener éstas la capacidad para

hidrolizar  $\beta(1,3)$  glucopolímeros presentes en la pared celular de hongos, se propuso que estas enzimas, junto con otras con actividad hidrolítica como son las quitinasas, podían formar parte de los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos [Linthorst y col., 1990; Memelink y col., 1990]. Su actividad antifúngica frente a hongos tales como *Aspergillus*, *Neurospora crassa* o *Fusarium*, ha hecho de estas enzimas herramientas importantes para el desarrollo de estrategias de resistencia en cultivos a hongos patógenos [Chen y col., 2000]. Además del papel de las  $\beta$ -1,3-glucanasas en la respuesta frente al ataque de patógenos, se ha comprobado la implicación de estas enzimas en diversos procesos fisiológicos del desarrollo de las plantas no infectadas, incluyendo la división celular, la liberación de esporas [Verma y col., 2005], el crecimiento del tubo polínico [Ori y col., 1990], la germinación de la semilla [Casacuberta y col., 1992], la floración [Lotan y col., 1989; Van Eldik y col., 1996], la movilización y almacenamiento de reservas en el endosperma de los granos de cereales. También se ha demostrado su papel relevante como alérgenos vegetales [Huecas y col., 2001; Palomares y col., 2005] (TABLA 4).

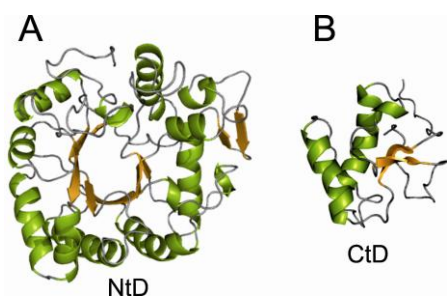
TABLA 4.  $\beta$ -1,3-glucanasas descritas como alérgenos

Alérgeno	Especie/nombre común	Número de acceso
<b>Bet v Glucanasa</b>	<i>Betula verrucosa</i> , abedul	-
<b>Cap a Glucanasa</b>	<i>Capsicum annuum</i> , pimiento	Q6RHR1
<b>Hev b 2</b>	<i>Hevea brasiliensis</i> , látex	A0A074
<b>Lyc e Glucanasa</b>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , tomate	Q01412
<b>Mus a 5</b>	<i>Musa acuminata</i> , banana	A7U7Q7
<b>Ole e 9</b>	<i>Olea europaea</i> , olivo	Q94G86
<b>Rob p Glucanasa</b>	<i>Robinia pseudoacacia</i> , robinia	-
<b>Sola t Glucanasa</b>	<i>Solanum tuberosum</i> , patata	P52400
<b>Vit v Glucanasa</b>	<i>Vitis vinífera</i> , uva	Q9M563

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son proteínas abundantes y distribuidas de manera ubicua en plantas. Estas enzimas se presentan como múltiples isoformas que difieren en su masa molecular, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y patrón de glicosilación. En función de la similitud estructural se ha establecido una

clasificación de  $\beta$ -1,3-glucanasas [Ward y col., 1991]. Las proteínas de Clase I son isoformas básicas, pueden ser inducidas por patógenos, se acumulan en vacuolas y parecen estar implicadas en el desarrollo normal de la planta [Bulcke y col., 1989]. Las de Clase II son ácidas y poseen una extensión C-terminal que les permite ser transportadas al medio extracelular. Las de Clase III incluyen proteínas inducidas por procesos infecciosos, sin extensión C-terminal y carecen de similitud de secuencia entre ellas [Thimmapuram y col., 2001]. Se ha descrito una Clase IV en la que están comprendidas dos  $\beta$ -1,3-glucanasas ácidas, sp41a y sp41b, que se acumulan en el estilo del tabaco pero que no se inducen por patógenos y que presentan un 80% de similitud con las de la Clase II [Bucciaglia y col., 1994].

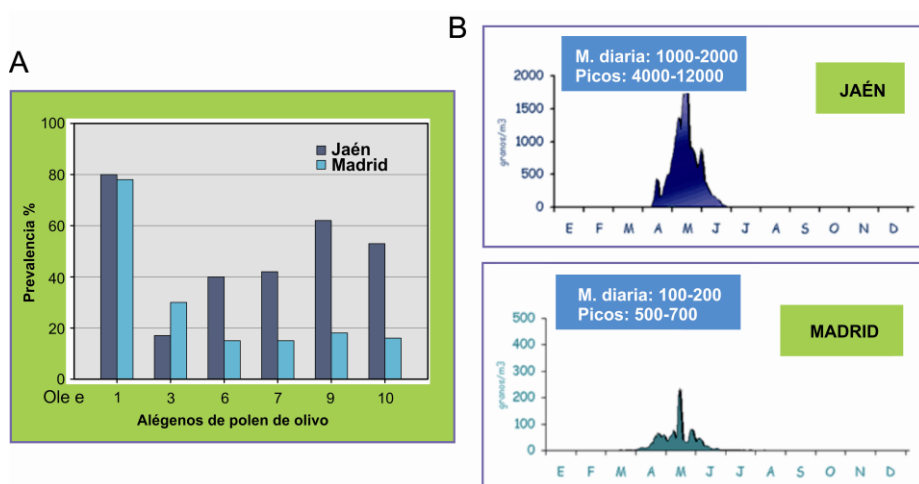
La mayoría de las  $\beta$ -1,3-glucanasas descritas son las denominadas cortas y se trata de proteínas con una masa molecular entre 33 y 36 kDa y una estructura tridimensional de “TIM-Barrel” con actividad catalítica. También se han descrito glucanasas largas (42-46 kDa), que constan del dominio catalítico N-terminal (NtD) y un dominio C-terminal (CtD) ( $\approx$  10 kDa) de unión a carbohidratos (CBM, del inglés “carbohydrate binding domain”) cuya estructura consiste en dos hélices  $\alpha$  paralelas, una pequeña lámina  $\beta$  antiparalela y una hélice 3-10 [Treviño y col., 2008] (FIG. 5). Los CBMs se agrupan en 55 familias que muestran notables variaciones en estructura y especificidad de ligando, ya que sus funciones son diversas. En cualquiera de los procesos en los que actúe, su principal papel es reconocer y unir carbohidratos de manera específica.



**FIGURA 5. Estructura tridimensional de los dominios de la  $\beta$ -1,3-glucanasas de polen de olivo. A, dominio catalítico modelado a partir de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de banana (PDB 2CYG) y B, dominio de unión a sustrato (CBM) (PDB 2JON) obtenido experimentalmente [Treviño y col., 2008].**

Además de las actividades bioquímicas atribuidas a las  $\beta$ -1,3-glucanasas, un importante carácter alergénico se ha asociado a diversos miembros de esta familia, tanto en pólenes [Huecas y col., 2001; Palomares y col., 2003; Palomares y col., 2005; Palomares y col., 2006] o frutas [Barre y col., 2009], como en látex [Alenius y col., 1995], donde estas moléculas representan importantes herramientas diagnósticas.

De entre los doce alérgenos identificados en polen de olivo, la  $\beta$ -1,3-glucanasa Ole e 9 puede ser considerada como un aeroalérgeno secundario o principal dependiendo de la concentración atmosférica de polen en el hábitat del paciente, llegando a tener una prevalencia superior al 65% en la población alérgica a polen de olivo de regiones con elevada densidad de este polen en el ambiente [Huecas y col., 2001; Barber y col., 2008] (FIG. 6). Existe gran variabilidad en la concentración de este alérgeno entre distintos lotes de polen normalmente provenientes de mezclas de diferentes variedades de olivo, alcanzando un valor de 161 veces entre las concentraciones extremas, mientras que otros alérgenos como Ole e 1 sólo varía unas 25 veces [Duffort y col., 2006]. El disponer de métodos de detección de Ole e 9, como un mAb específico, permite estandarizar los extractos polínicos para adecuarlos a los tratamientos de inmunoterapia [Duffort y col., 2006; Barber y col., 2007].



**FIGURA 6. Dependencia geográfica de la prevalencia de alérgenos del polen de olivo y carga polínica. A, prevalencia de distintos alérgenos de polen de olivo en Jaén y Madrid. B, La producción diaria de polen de olivo en las dos provincias, a lo largo del año.**



Ole e 9 es una glicoproteína ácida (pI 5.62) de 434 aminoácidos (46044 Da) constituida por dos dominios independientes, uno N-terminal (NtD) de 36 kDa y otro C-terminal (CtD) de 10 kDa, unidos por un segmento de conexión. Este alérgeno posee siete residuos de cisteína, seis de los cuales se localizan en el dominio C-terminal. Ole e 9 posee dos sitios potenciales de N-glicosilación localizados en las posiciones 329 y 421 de la proteína madura, estando únicamente ocupado por un grupo glicosídico la Asn-329 [Palomares, 2005]. Ambos dominios han sido producidos en la levadura *Pichia pastoris*. El NtD contiene una tétrada de aminoácidos característicos y conservados en glucanasas que componen el sitio catalítico [Palomares y col., 2005]. El CtD, producido en la levadura *P. pastoris* [Palomares y col., 2003] es capaz de unir laminarina –un  $\beta$ -1,3-glucano- por lo que se ha sugerido su papel como módulo de captura del sustrato para el dominio catalítico N-terminal [Rodríguez y col., 2007]. Además, se ha clasificado como perteneciente a la familia CBM-43 como su homólogo Ole e 10 [Barral y col., 2005] y su estructura 3D se ha determinado por RMN [Treviño y col., 2008]. Se han localizado en la estructura tridimensional del CtD los epítomos secuenciales IgG así como los epítomos IgE gracias a la utilización de péptidos sintéticos solapantes y a los datos disponibles de la estructura, pudiéndose asignar 4 regiones antigénicas implicadas en epítomos secuenciales IgG, y 4 regiones expuestas implicadas en la interacción con IgE [Treviño y col., 2008].

## 7.2. Familia de proteínas de defensa PR-5: TLPs

Las TLPs son polipéptidos de unos 200 residuos aminoacídicos que presentan elevada similitud de secuencia con la taumatina, una proteína que confiere sabor dulce y que fue descrita originalmente en el arbusto procedente de África tropical *Thaumatococcus daniellii*. Debido a su expresión inducible por estrés o ataque de patógenos, las TLPs se clasifican como proteínas relacionadas con patogénesis, concretamente dentro de la familia PR-5.

Las TLPs pueden clasificarse en 3 grupos: (i) las que se producen en respuesta a la infección por patógenos, (ii) las que se producen en respuesta a estrés osmótico, llamadas osmotinas, y (iii) las proteínas antifúngicas presentes en las semillas de cereales. Muchas TLPs son resistentes a proteasas y a desnaturalización inducida por pH o calor [Wagner y col., 2004].

Las TLPs se encuentran en una gran diversidad de organismos, tales como nematodos, insectos, hongos, y plantas gimnospermas, angiospermas y briofitas. Son proteínas que se encuentran de manera universal en plantas, y se han descrito un elevado número de ellas en *Arabidopsis thaliana* (28), en *Oryza sativa* (31), *Picea glauca* (13) y *Pinus manticola* (10), entre otras. Las TLPs de plantas, animales y hongos basidiomicetes comparten una gran similitud con la taumatina y poseen un motivo secuencial característico G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X-(1,2)-Q]-X-(2,3)-C [Jami y col., 2007]. Su masa molecular oscila entre 21 y 26 kDa, poseen 16 residuos de cisteína y se las conoce como “large” TLPs (tipo L). El grupo de las “small” TLPs (tipo S) tienen una masa molecular entre 16 y 17 kDa y sólo poseen 10 cisteínas. El elevado número de puentes disulfuro de estas moléculas les proporciona una gran estabilidad térmica y frente a pH extremos [Fierens y col., 2009].

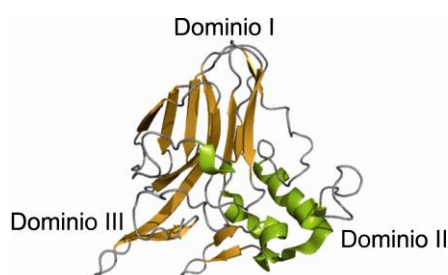
Dentro de la superfamilia de TLP de plantas se han identificado alérgenos de frutas y pólenes. Como alérgenos alimentarios se han descrito en cereza Pru av 2 [Fils-Lycaon y col., 1996; Inschlag y col., 1998], pimienta Cap a 1 [Jensen-Jarolim y col., 1998; Wagner y col., 2004], kiwi Act c 2 [Gavrovic-Jankulovic y col., 2002] y Act d 2 [Bublin y col., 2008], manzana Mal d 2 [Krebitz y col., 2003], TLP de uva [Pastorello y col., 2003], TLP de aceituna [Palomares y col., 2008] y plátano Mus a 4 [Leone y col., 2006; Palacín y col., 2012], entre otros. En pólenes hay varias TLP descritas como alérgenos, siendo las más estudiadas las de Jun a 3 de *Juniperus ashei* [Midoro-Horiuti y col., 2000], Cup a 3 de *Cupressus arizonica* [Cortegano y col., 2004] y Cry j 3 de *Cryptomeria japonica* [Fujimura y col., 2007] (TABLA 5).

TABLA 5. TLPs descritas como alérgenos

Alérgeno	Especie/nombre común	Número de acceso
Act c 2	<i>Actinidia chinensis</i> , kiwi Gold	P83958
Act d 2	<i>Actinidia deliciosa</i> , kiwi	JX905284
Art v TLP	<i>Artemisia vulgaris</i> , artemisia	Q9462Z0
Bet v TLP	<i>Betula verrucosa</i> , abedul	Q9FSG7
Bra o TLP	<i>Brassica oleracea</i> , col	P02884
Cap a 1	<i>Capsicum annuum</i> , pimiento	Q9ARG0
Cas s TLP	<i>Castanea sativa</i> , castaña	Q9SMH2
Cor a TLP	<i>Corylus avellana</i> , avellana	P83336
Cuc m TLP	<i>Cucumis melo</i> , melón	Q6S9D1
Cry j 3	<i>Cryptomeria japonica</i> , cedro japonés	QaW6C7
Cup a 3	<i>Cupressus arizonica</i> , arizónica	Q69CS2
Cup s 3.0102	<i>Cupressus sempervirens</i> , ciprés	Q69CS3
Jun a 3	<i>Juniperus ashei</i> , sabina	P81295
Jun r 3.1	<i>Juniperus rigida</i> , enebro	Q69CS6
Lac s TLP	<i>Lactuca sativa</i> , lechuga	P83959
Mal d 2	<i>Malus domestica</i> , manzana	Q3BCT8
Mus a 4	<i>Musa acuminata</i> , plátano	1Z3Q
Pla a TLP	<i>Platanus acerifolia</i> , plátano de sombra	P31110
Pru av 2	<i>Prunus avium</i> , cereza	P50694
Pru du 2.01A	<i>Prunus dulcis</i> , almendra	ACE80956.1
Pru p 2.0201	<i>Prunus pérsica</i> , melocotón	gi190613905
NP24I	<i>Solanum lycopersicum</i> , tomate	P12670
Tri a TLP	<i>Triticum aestivum</i> , trigo	P27357
Trip s TLP	<i>Triplochiton scleroxylon</i> , obeche	82445
Vit v TLP	<i>Vitis vinifera</i> , uva	A9CSP0

La frecuencia de sensibilización de esta familia de alérgenos es muy variable y depende de diversos factores: i) técnica utilizada para su detección (immunodetección, ELISA, RAST o prueba cutánea), ii) procedencia geográfica de la población de estudio, iii) criterios de reclutamiento de los pacientes. En determinados casos, se han detectado elevados niveles de prevalencia, siendo por ejemplo el 75% de los pacientes de Estados Unidos alérgicos a manzana positivos por inmunotinción a la TLP de esta fuente vegetal, Mal d 2 [Hsieh y col., 1995], y cerca del 70% de los pacientes de las Islas Canarias alérgicos a melocotón tienen IgE frente a la TLP de esta fruta, Pru p 2 [Palacín y col., 2012].

Se ha determinado la estructura terciaria por difracción de rayos X de siete taumatinas/TLPs: taumatina de *Thaumatococcus daniellii* [van der Wel y col., 1975], PR-5d de tabaco [Batalia y col., 1996], zeamatina de maíz [Batalia y col., 1996], osmotina de tabaco [Min y col., 2004], y Pru av 2 de cereza [Dall'Antonia y col., 2005], TLP de banana [Leone y col., 2006] y NP24-I de tomate [Ghosh y col., 2008]. Todas ellas muestran tres dominios estructurales, con una hendidura entre los dominios I y II, que resulta estar compuesta por residuos ácidos en aquellas proteínas PR-5 que presentan carácter antifúngico. El dominio I consiste en un barril  $\beta$ , característico de proteínas como las lectinas, que forma el núcleo de la molécula de TLP. El dominio II consta de varios bucles y el dominio III de uno más pequeño (FIG. 7).



**FIGURA 7.** Estructura tridimensional de la TLP de cereza, Pru av 2 (PDB 2AHN).

Algunas TLPs tienen la capacidad de unir  $\beta$ -1,3-glucanos insolubles [Trudel y col., 1998; Grenier y col., 1999]. Esta interacción puede ocurrir de manera conjunta con  $\beta$ -1,3-glucanasas para impedir la síntesis de la pared celular de hongos, así como su ensamblaje durante el proceso de extensión de las hifas [Osmond y col., 2001]. La actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de las TLPs de plantas no siempre está relacionada con su actividad antifúngica [van Loon y col., 2006].

## 8. ALÉRGENOS RECOMBINANTES

La aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la caracterización de los alérgenos ha mejorado notablemente el conocimiento de éstos. Ha permitido la determinación de la secuencia primaria completa de los alérgenos con mayor relevancia clínica, así como de algunos alérgenos secundarios de distintas fuentes, facilitando el conocimiento de su estructura química, el esclarecimiento de la existencia de proteínas homólogas y de epítomos comunes en fuentes próximas o alejadas filogenéticamente, y también la obtención de alérgenos recombinantes.

Los alérgenos recombinantes obtenidos deben poseer características moleculares e inmunológicas equivalentes a las del alérgeno natural, y pueden producirse en grandes cantidades con gran calidad y pureza. Éstos, por tanto, serían aplicables tanto en la diagnosis como en la terapia de las reacciones alérgicas.

### 8.1. Producción de proteínas recombinantes: sistemas de expresión

Los *sistemas de expresión procariotas*, fundamentalmente *Escherichia coli* (FIG. 8A), han permitido la obtención de gran número de proteínas recombinantes con correcto plegamiento y biológicamente activas. *E. coli* es una bacteria fácil de cultivar y de modificar genéticamente. A nivel de síntesis de proteínas, su producción es rápida y de alto rendimiento, acumulándose proteína recombinante en una proporción que puede llegar hasta el 80% de su peso seco, lo que hace que sea la primera posibilidad que se tiene en cuenta cuando se quiere expresar un DNA para producir una proteína. Sin embargo, cuando las bacterias son forzadas a producir grandes cantidades de proteína se producen formas recombinantes mal plegadas que ocasionan agregados citoplasmáticos insolubles, es decir, cuerpos de inclusión, que son difíciles de procesar para obtener la proteína en su forma activa. Se han desarrollado aproximaciones para reducir la producción de cuerpos de inclusión, aproximaciones que incluyen el direccionamiento de la proteína hacia el espacio periplásmico mediante la utilización

de secuencias señal específicas y el crecimiento de las bacterias a temperaturas inferiores a las estándar. Las bacterias son, en cualquier caso, útiles para la expresión de proteínas de pequeño tamaño y sin modificaciones postraduccionales.

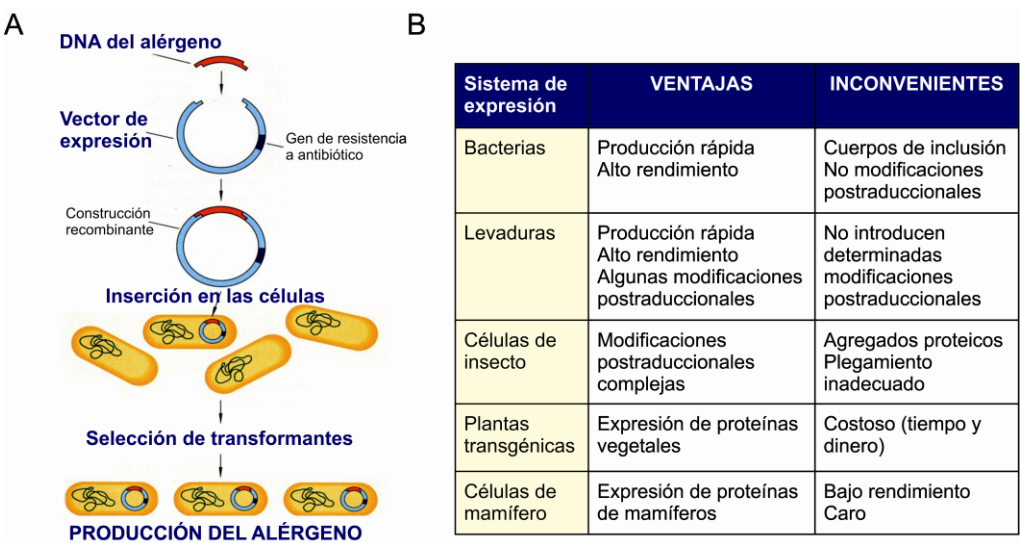


FIGURA 8. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes. A, Esquema de la producción recombinante en levaduras y bacterias. B, Tabla comparativa de los distintos sistemas de expresión.

Dentro de los *sistemas de producción eucariotas*, los que se utilizan más habitualmente son las levaduras (FIG. 8A) y las células de insecto, aunque las plantas transgénicas y las células de mamífero también pueden ser en ocasiones ventajosas (FIG. 8B).

Las **levaduras** presentan muchas de las ventajas en comparación con los sistemas bacterianos -alto rendimiento, estabilidad de la cepa productora, crecimiento con alta densidad, productividad, medios baratos y químicamente definidos-. Son capaces de llevar a cabo reacciones de glicosilación, añadiendo sólo residuos de manosas sobre un núcleo de dos N-acetilglucosaminas, y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. La

adición de una secuencia señal en el gen permite la excreción de la proteína al medio de cultivo. Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *P. pastoris* son muy utilizadas en la expresión de genes heterólogos. *P. pastoris* presenta ventajas como la no hiperglicosilación de las proteínas expresadas, ya que al ser una levadura metilotrófica puede crecer en soluciones con metanol, lo que elimina la posibilidad de crecimiento de otros microorganismos competidores y además tiene la posibilidad de integrar varias copias del vector en su genoma, dando lugar a transformantes estables.

Otros sistemas de interés para la expresión de proteínas recombinantes que requieren modificaciones postraduccionales complejas para su correcta actividad son las **células de insecto**. La transformación se realiza mediante vectores basados en baculovirus. El problema de este sistema son los fallos en la glicosilación y la aparición de agregados o proteínas mal plegadas.

Las **células de mamífero** son las idóneas para producir proteínas de mamíferos que necesiten modificaciones postraduccionales, aunque su rendimiento es bajo comparado con procariotas o levaduras, y su mantenimiento es caro. Algunos ejemplos son las células de ovario de hámster chino (CHO), los mielomas de ratón (NSO), de riñón de hámster (BHK), de simio y de humano (BHK).

Las **plantas transgénicas** presentan menos riesgo de contaminación con patógenos animales. El escalado es más barato y es un buen sistema para producir proteínas vegetales con modificaciones postraduccionales, como sería el caso de los alérgenos de pólenes y alimentos vegetales.

## **9. DIAGNÓSTICO Y TERAPIA DE LA ALERGIA**

Una de las metas de la investigación en alergia es la mejora en el diagnóstico y la terapia. Tanto el diagnóstico de las enfermedades alérgicas como la terapia de las mismas se han realizado históricamente con los extractos crudos preparados a partir de las fuentes alérgicas, y en muy pocos casos estandarizados y de composición conocida. Los extractos son útiles para determinar los pacientes sensibilizados a esa fuente biológica, y para medir la cantidad de IgE total del paciente frente al conjunto de alérgenos presentes en ella. Pero su uso presenta problemas tanto por la obtención de falsos positivos -por la presencia de compuestos no alérgicos como lípidos, hidratos de carbono pigmentos, ácidos nucleicos, etc., y contaminantes- como por la obtención de falsos negativos a causa de la carencia de alérgenos importantes en una proporción adecuada, o debido a la baja inmunogenicidad de determinados alérgenos. Por el contrario, la mezcla de alérgenos purificados permite un control de la concentración e integridad de los mismos, así como de la composición exacta de la mezcla. Por ello, el disponer de alérgenos recombinantes, que conserven los epítomos presentes en los extractos alérgicos naturales, es fundamental para una mejora en el diagnóstico y la terapia de estas afecciones. Los alérgenos pueden purificarse mediante su aislamiento de la fuente natural o mediante producción recombinante de los mismos, presentado estos últimos ciertas ventajas sobre los primeros en cuanto a la sencilla purificación y alto rendimiento, especialmente en aquellos casos en los que el alérgeno natural está presente en muy pequeña cantidad en la fuente de origen [Rodríguez y col., 2007].

### **9.1. Diagnóstico**

Los pacientes que sufren alergia exhiben una gran variedad de manifestaciones clínicas que afectan a diferentes órganos, que como ya se ha



mencionado, incluyen rinoconjuntivitis, asma, diarrea, reacciones en la piel, hasta reacciones severas de carácter sistémico como el choque anafiláctico.

Las enfermedades alérgicas se diagnostican realizando en primer lugar una historia clínica (anamnesis). Este proceso puede ir seguido de determinadas pruebas clínicas o bien de la remisión a otro especialista para confirmar el diagnóstico. Las pruebas diagnósticas pueden ser de dos tipos:

- Pruebas de punción cutáneas ("prick-tests"), que consisten en provocar una reacción alérgica en la epidermis del paciente al añadir una pequeña cantidad de alérgeno en la piel.
- Determinación *in vitro* de los niveles de IgE específica presentes en el suero del paciente (RAST, ImmunoCAP o ELISA).

Para la diagnosis de las alergias alimentarias o a fármacos se realizan además pruebas de provocación mediante la administración de pequeñas cantidades de la fuente alérgica sospechosa principalmente por vía oral. Estas pruebas se realizan bajo control médico especializado por la peligrosidad que conllevan.

En los últimos años, los abordajes proteómicos para la caracterización bioquímica e inmunológica de alérgenos han permitido adquirir un mayor conocimiento de los componentes alergénicos de una fuente biológica. El perfil proteómico de los extractos de pólenes analizado mediante las técnicas inmunológicas se ha utilizado para detectar la presencia de nuevos alérgenos en diversas fuentes biológicas. En particular, la electroforesis bidimensional (2D-electroforesis) junto con la espectrometría de masas (MS) han sido técnicas muy eficaces para analizar extractos proteicos complejos, pudiendo separar los componentes alergénicos (mayoritarios y minoritarios), analizar las diferentes isoformas e identificar aquellas que son alergénicas [González-Buitrago y col., 2007]. Sin embargo, los microarrays son una herramienta proteómica muy útil para la identificación *in vitro* de los alérgenos a los que los pacientes están sensibilizados y permiten analizar cientos de muestras a la vez con un gasto reducido tanto de proteína (0,05 µg/µl) como de suero (20 µl).

En los años 90, varios grupos ya demostraron que un reducido número de alérgenos recombinantes puede ser suficiente para sustituir a los extractos naturales en la determinación de los perfiles de sensibilización de los pacientes [Valenta y col., 1991; Valenta y col., 1992; Moser y col., 1994], a lo que posteriormente se le ha denominado **diagnóstico por componentes** (CRD, del inglés “component-resolved diagnosis”) [Valenta y col., 1999]. Con la disponibilidad de la secuencia de los alérgenos, así como de alérgenos recombinantes purificados, se han podido estudiar las respuestas inmunes alérgeno-específicas, así como establecer modelos animales basados en alérgenos clínicamente relevantes como Bet v 1 y Bet v 2 de abedul [Vrtala y col., 1996], Ara h 1 y Ara h 2 de cacahuete [Li y col., 2000], Ole e 1 y los dominios recombinantes N y C-terminal de Ole e 9 [Barral y col., 2006; Palomares y col., 2006] o Der p 1 y Der p 2 de ácaros [Szalai y col., 2012] por citar algunos ejemplos. El diagnóstico por componentes puede ser decisivo en aquellos casos en los que el alérgeno se encuentre en poca cantidad en la fuente biológica -Ole e 7 y Ole e 9 en el grano de polen de olivo [Villalba y col., 2013]- ya que la utilización del extracto proteico completo no sería adecuado para el diagnóstico por *prick test* o para la determinación *in vitro* de IgE.

## 9.2. Terapia

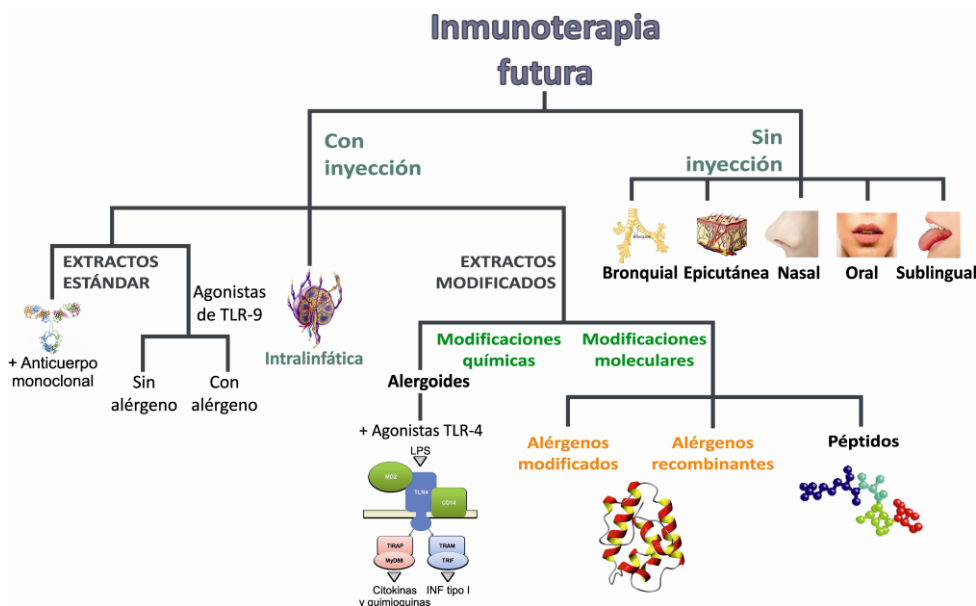
En cuanto a la terapia de la alergia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la **inmunoterapia** es el único tratamiento curativo. Actúa en la desensibilización del paciente tras administrar dosis crecientes del extracto alérgico correspondiente. La inmunoterapia (IT) con extractos alérgénicos como vacunas antialérgicas es capaz de evitar la progresión de la enfermedad y puede utilizarse para tratar distintos tipos de alergia, como la alergia al polen, a los ácaros, al veneno de himenópteros o al epitelio de ciertos animales. La **inmunoterapia subcutánea (SCIT**, del inglés “subcutaneous immunotherapy”) y **sublingual (SLIT**, del inglés “sublingual immunotherapy”) con extractos alérgénicos sin modificar son las inmunoterapias que se practican habitualmente, siendo comparable la eficacia de ambas aunque no todos

los alérgenos puedan administrarse indistintamente por una u otra vía [Burks y col., 2013]. Estos tratamientos requieren de una administración regular durante varios años. En cuanto a los efectos secundarios que de ellos derivan, pueden ser locales o sistémicos en el caso de SCIT y, aunque el 86% de las reacciones adversas son moderadas, se puede desencadenar en ocasiones anafilaxia e incluso la muerte del paciente [Cox y col., 2010]. En Europa la SLIT representa alrededor del 80% de la IT, ya que es más segura y fácil de administrar [Cox y col., 2009], siendo las reacciones adversas más comunes de carácter local (edema local o prurito en la mucosa oral) [Cox y col., 2011].

En la alergia a alimentos la inmunoterapia oral (OIT) y la SLIT son efectivas en la desensibilización a alérgenos de la leche, huevo, cacahuets, y avellana. Los efectos secundarios son principalmente locales, aunque un 15% de los pacientes presenta afecciones gastrointestinales. Ninguno de los dos procedimientos está recomendado en el ámbito clínico para el tratamiento de alergias alimentarias de manera generalizada por la falta de parámetros bien definidos en cuanto a riesgos, dosis óptimas y perfil de pacientes establecido [Burks y col., 2013].

Se han realizado en los últimos años avances para desarrollar terapias más efectivas mediante el uso de vías de administración alternativas como la intralinfática (ILIT), que presenta efectos más beneficiosos y prolongados con tan solo 3 inyecciones, por lo que se reduce el tiempo de tratamiento; o la epicutánea (EPIT) con la que se han obtenido buenos resultados tanto en alergia alimentaria como por inhalación (FIG. 9). La utilización de nuevos adyuvantes como vehículos de administración puede ser otra aproximación novedosa para el tratamiento de la alergia. Así, las vacunas basadas en exosomas -nanovesículas capaces de inducir tolerancia y protección frente a la sensibilización alérgica en ratones y que se han utilizado como agentes terapéuticos en sustitución a las terapias basadas en DCs para el tratamiento de cánceres no operables y en estadios avanzados- podrían representar una terapia alternativa en humanos para el tratamiento de enfermedades alérgicas,

así como de otras patologías que presenten respuesta inmune exacerbada como artritis reumatoide o rechazo de trasplantes [Prado y col., 2008].



**FIGURA 9. Nuevos abordajes en la IT.** Adaptado de [Burks y col., 2013].

Uno de los principales “cuellos de botella” de la inmunoterapia específica (SIT) radica en la utilización de extractos proteicos mal caracterizados, por la dificultad que conlleva su correcta estandarización. Estos problemas podrían solventarse en parte con la utilización de alérgenos purificados a partir de su fuente natural o recombinantes -y formas hipoalérgénicas derivada de ellos [Wagner y col., 2008; Asturias, 2009; Mas y col., 2012]- así como de alérgenos híbridos con epítomos de varios alérgenos principales, tanto para el diagnóstico como para la inmunoterapia, aunque su uso legal, en España, no ha sido aprobado todavía para este último propósito. Es clave por tanto, conocer el contenido alérgénico de una fuente determinada y poder disponer de los alérgenos purificados para diagnosticar y tratar adecuadamente a los pacientes.

## 10. OBJECTIVES/Objetivos

- The isolation of the olive fruit TLP, nOle e 13, from the natural source. The molecular and immunological characterization of this protein.
- The sequencing, cloning and recombinant production of Ole e 13 in order to settle the difficulties surrounding the obtention of a pure nOle e 13 preparation due to the high lipidic content of this fruit. The molecular, structural, functional and immunological characterization of this protein.
- To study the cross-reactivity between Ole e 13 and other allergenic TLPs from vegetable food and pollens.
- To compare the allergenic character of both raw and processed olive fruit.
- The sequencing, cloning and recombinant production of the ash pollen  $\beta$ -1,3-glucanase Fra e 9 in order to settle the difficulties surrounding the obtention of a pure Fra e 9 preparation due to the low content of this protein in the ash pollen extract. The molecular, structural, functional and immunological characterization of this protein.
- To compare the allergenic character and structural and molecular properties of Fra e 9 and its olive pollen counterpart Ole e 9.
- To find new allergenic  $\beta$ -1,3-glucanases homologue to Fra e 9 and/or Ole e 9 in vegetable and pollen sources.
- To study the cross-reactivity between Fra e 9 and other allergenic  $\beta$ -1,3-glucanases from vegetable food and pollens.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Materials and methods**





## MATERIALES Y MÉTODOS/Materials and methods

---

### 1. PURIFICACIÓN DE LA TAUMATINA DE ACEITUNA

#### 1.1. MATERIALES

##### 1.1.1. Aceitunas

Las aceitunas comestibles y aceitunas crudas se obtuvieron, respectivamente, de tiendas de alimentación locales y de un olivar, siendo ambas *O. europea* de la variedad manzanilla.

##### 1.1.2. Soluciones de uso general

**PBS** (Tampón fosfato salino): NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM, pH 7.2.

**Tampón de aplicación de proteínas en PAGE-SDS:** Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), EDTA 2 mM y azul de bromofenol 0.01% (p/v).

**Tampón de electroforesis PAGE-SDS:** Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, y 0.1 % de SDS (p/v).

#### 1.2. MÉTODOS

##### 1.2.1. Preparación de extracto proteico de aceituna

La carne de las aceitunas crudas fue separada manualmente del hueso, cortada en pedazos y liofilizada. El material obtenido fue pulverizado moliendo con un mortero en aire líquido. El polvo resultante fue sometido a tres procesos de

deslipidización con éter/etanol (3:1). El sedimento fue secado al aire, y después resuspendido en 5% PBS y puesto en agitación suave durante 1 h. El sobrenadante se separó por centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos y fue dializado frente a bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0, durante 16 h. Todos los pasos se realizaron a 4°C. Los sobrenadantes se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su uso.

### ***1.2.2. Purificación de Ole e 13 de carne de aceituna***

El extracto de carne de aceituna liofilizado fue disuelto en bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0, y tras su centrifugación se aplicó en una columna de Sephadex G-50 (39 cm x 2.75 cm) equilibrada en el mismo tampón. El flujo se mantuvo a 180 ml/h, y las fracciones obtenidas fueron analizadas en geles de PAGE-SDS mediante tinción con azul de Coomassie y por Western blotting utilizando el suero del paciente con asma ocupacional (paciente J). Las fracciones que contenían proteínas reactivas a las IgE del suero fueron reunidas, liofilizadas y sometidas a una cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). Para esta última etapa de purificación se empleó una columna Ultrasphere Nucleosil C-18 (Scharlab), llevando a cabo la elución de la proteína con un gradiente (0-60%) de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoracético (v/v) en 60 min, a un flujo de 1 ml/min.

### ***1.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS)***

Las electroforesis de proteínas se llevaron a cabo en un sistema Mini-Protean II (Bio-Rad). Se utilizaron geles de 0.75 mm de espesor, 7 cm de alto y 8 cm de ancho. Las muestras se corrieron en geles al 15% de poliacrilamida, con un gel concentrante del 4%.

Para su aplicación en los geles, las muestras se resuspendieron en tampón de aplicación, conteniendo en determinados casos un 5% (v/v) de  $\beta$ MErctoetanol ( $\beta$ ME), en cuyo caso se calentaron a 90 °C durante 10 minutos. Las electroforesis se

desarrollaron aplicando 25 mA por gel hasta perder el marcador del frente (azul de bromofenol) y se utilizaron patrones de masa molecular (Fermentas) como referencia.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se detectaron mediante tinción por azul brillante de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25% (p/v), 45% metanol (v/v) y 10% ácido acético (v/v)) [Fairbanks y col., 1971]. Se utilizó ácido acético al 7.5% (v/v) para eliminar el exceso de colorante.

#### **1.2.4. Maceración de las aceitunas crudas con sosa**

Las aceitunas naturales se trocearon y se introdujeron en bolsas de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro para ser sometidas a diálisis en 0.25 M de NaOH durante 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se dializaron dos veces durante 1 h frente a agua para retirar el exceso de sales. Normalmente, a las aceitunas comerciales se les adicionan diversas especias -orégano, romero, tomillo, hinojo o laurel- o condimentos para proporcionar sabor. Este tratamiento se ha obviado en el proceso de maceración, pero se asume para las aceitunas comerciales que se encuentran en el mercado. Tras el tratamiento con NaOH se procedió a la extracción proteica tal y como ya se ha descrito para las aceitunas naturales y comestibles.

## **2. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS**

### **2.1. MATERIALES**

#### **2.1.1. Microorganismos**

**TOP10:** *E. coli* con una eficiencia de transformación de  $1 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g DNA superenrollado. Su genotipo es el siguiente: F-*mcrA* $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)*7697 *galUgalK*rpsL (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*.

**DH5 $\alpha$ F'**: F'endA1 hsdR17 ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) supE44tthi-1recA1 gyrA(NalR) relA1  $\Delta(lacZYA-argF')$  U169 deoR [ $\Phi$ 80dlac $\Delta(lacZ)$ M15].

### 2.1.2. Vectores plasmídicos

**pCR2.1**: utilizado para clonar fragmentos de DNA obtenidos por PCR siguiendo el protocolo del kit Topo TA cloning (Invitrogen). Se trata de un plásmido linealizado de 3.9 kpb que contiene un gen de resistencia a ampicilina. En el extremo 5' posee un residuo de 3' desoxitimidina para facilitar la inserción de los fragmentos amplificados por PCR que presentan una adenosina protuberante en 3'.

### 2.1.3. Medios de cultivo

**LB** [Sambrook y col., 1989]: medio utilizado para el crecimiento de cepas bacterianas para la purificación de plásmidos. Este medio contiene: bactotripton 1% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v) y NaCl 1% (p/v). Para el crecimiento de células en medio sólido se añadió 15 g/l de agar. Para la selección de transformantes de *E. coli* se añadió al medio ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o zeocina (25  $\mu$ g/ml).

**SOC**: se ha utilizado para el crecimiento de células TOP10 durante el proceso de transformación. Se compone de tripton 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM.

**$\phi$ Broth**: se utilizó para el crecimiento de células DH5 $\alpha$ F' transformadas con DNA plasmídico. Se compone de bactotripton 2% (p/v), extracto de levadura 0.5% (p/v), MgSO<sub>4</sub> 0.4% (p/v) y KCl 10 mM. El pH se ajustó a 7.6 con KOH 4 M.

### 2.1.4. Soluciones de uso general

**TAE**: Tris-acetato 40 mM (484 g/l de Tris base y 1.14 ml/l de ácido acético glacial), EDTA 2 mM.

**TE**: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5-8.0.

**Tampón de aplicación de DNA (6x):** azul de bromofenol 0.25% (p/v), cianol de xileno 0.25 (p/v) y glicerol 30% (v/v).

**Tampón de lisis de colonias:** Tris 1 M, EDTA 0.5 M, NaOH 10 N, y SDS 20% (p/v).

**Tampón de electroforesis de RNA:** MOPS 20 mM, acetato sódico 5 mM, pH 7.0 y EDTA 1 mM.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. Aislamiento de RNA**

Para el aislamiento de RNA total de pólenes y de aguacate se utilizó el RNAqueous®-Midi Kit (Ambion), basado en un proceso de lisis con isotiocianato de guanidinio, desnaturalización y filtrado a través de filtros de fibra de vidrio, partiendo de 0.1 g a 0.5 g de tejido. El homogenizado de las muestras se realizó en la solución de lisis proporcionada por el kit (6 ml/ 0.5 g de muestra) con la ayuda de un Polytron (Brinkmann Instruments) y se añadieron 500 µl de Plant RNA Isolation Aid (Ambion) para la eliminación de polifenoles y polisacáridos de las muestras. La extracción de RNA total se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA se eluyó por triplicado con 500 µl de tampón de elución para una mayor eficiencia de recuperación. Las muestras se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol y 1/10 de acetato sódico 3 M, a -20 °C y se resuspendieron en agua estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). La concentración de las muestras se estimó espectrofotométricamente.

La extracción de RNA total de carne de aceituna natural se realizó a partir de 2 g de aceituna liofilizadas. Se homogenizaron las aceitunas con un Polytron en 12 ml de isotiocianato de guanidinio 4 M con 1% de βME. Se añadió a la mezcla N-laurilsarcosinato sódico 0.5% (p/v) agitando en vórtex 3 veces durante 5 segundos. Se centrifugó el homogenizado en un rotor flotante durante 30 min a 4500 rpm y 20 °C. El

sobrenadante se recoge y centrifuga 20 min a 6000 rpm y 20 °C. Los 3.5 ml de sobrenadante obtenidos se depositaron sobre 9.7 ml de CsCl 5.7 M con EDTA 10 mM y se ultracentrifugó a 32000 rpm durante 18 h a 20 °C en un rotor SW-40 (Beckman). El sedimento se lavó con 100 µl de etanol 70% a temperatura ambiente para eliminar los restos de CsCl y se dejó secar. La muestra se resuspendió en 100 µl de TE con SDS 0.1% (p/v) y se precipitó con AcNa 3 M pH 5.2 y etanol puro, según el método de [Sambrook y col., 1989]. El RNA se disolvió en 100 µl de agua estéril tratada con DEPC y su concentración se estimó espectrofotométricamente.

### **2.2.2. Síntesis de cDNA**

El cDNA se sintetizó a partir de RNA total aislado utilizando la enzima transcriptasa reversa *Superscript II* (GibcoBRL) según las instrucciones del *SMART RACE cDNA Amplification kit* (Clontech).

### **2.2.3. Electroforesis de ácidos nucleicos**

El análisis de plásmidos y fragmentos de DNA se realizó mediante geles de agarosa (Laboratorios Conda) al 0.8-1% (p/v) en tampón TAE, según [Sambrook y col., 1989]. Las electroforesis preparativas se desarrollaron a 4 °C en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Ecogen) al 1%. El DNA se visualizó por tinción con bromuro de etidio e iluminación con luz UV de onda media.

La electroforesis de RNA se llevó a cabo en geles de agarosa al 2% (p/v) en presencia de formaldehído al 6% (v/v). A las muestras de RNA se les añadió bromuro de etidio para su visualización en el gel tras la electroforesis.

### **2.2.4. Amplificación de DNA por PCR**

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler. Las condiciones de cada reacción variaron en función de la enzima utilizada, así como del tamaño del fragmento a amplificar,

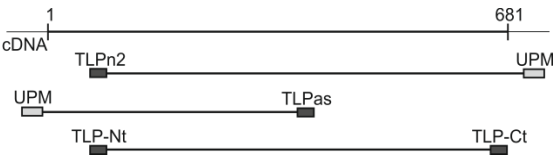
oscilando el número de ciclos entre 25-30 y la temperatura de hibridación variable en función de los cebadores a utilizar, y siempre alrededor de 5 °C inferior a la temperatura de desnaturalización (Tm) calculada para los mismos.

Amplificación del gen de Ole e 13

Para la amplificación de la secuencia de Ole e 13 completa se partió de la secuencia obtenida por degradación de Edman de la proteína natural [Palomares y col., 2008]. Se necesitaron varias etapas de amplificación para la obtención de la secuencia completa, detalladas en la figura 10, para lo cual se utilizó como molde el cDNA total de carne de aceituna y la enzima *Advantage Taq* polymerase (Clontech). Los cebadores utilizados se describen en la Tabla 6.

**TABLA 6. Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de Ole e 13 mediante**

Cebador	Secuencia de nucleótidos		Secuencia de aminoácidos
<b>TLPn2</b>	5' - ATHAAYGARTGYACNTAYAC - 3'	Sense	IVNQCTYT (25-32)
<b>TLPas</b>	5' - GGCAAATTCGGCTAGGGTATTAGG - 3'	Antisense	PNTLAEFA (87-94)
<b>UPM</b>	5'- CTAATACGACTCATAGGGCAAGCAAGC AGTGGTAACAACGCAGAGT - 3'	---	---
<b>TLP-Nt</b>	5'- cgcgctcagagaagaGCCACTTTTGACATTGTA AACCAA-3'	Sense	ATFDIVNQ (1-8)
<b>TLP-Ct</b>	5'- ctgcggccgctcaCGGGCAGAAGACAACACG - 3'	Antisense	RVVFCP (215-221)



**FIGURA 10. Estrategia de clonación de Ole e 13.** Etapas de PCR realizadas con los distintos cebadores (TLPn2, TLPas, UPM, TLP-Nt y TLP-Ct).

La primera etapa de amplificación se llevó a cabo con el oligonucleótido TLPn2 y el cebador no específico UPM. Con esta amplificación se obtuvo un fragmento de 591 pb. En base a la secuencia obtenida, se diseñó el oligonucleótido TLPas, que junto con UPM permitió la secuencia hacia 5' incluyendo el péptido señal. Finalmente, para obtener la secuencia completa se realizó una última amplificación con los cebadores

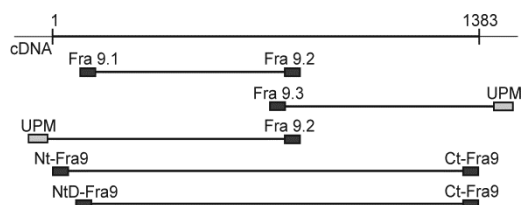
TLP-Nt y TLP-Ct, que se utilizaron para la clonación final del cDNA de Ole e 13 en el vector de expresión de *P. pastoris* pPICZαA y que presentan los sitios de restricción *Xho*I y *Not*I, respectivamente, subrayados en la secuencia de nucleótidos.

### Amplificación del gen de Fra e 9

El cDNA total de polen de fresno se utilizó para obtener la secuencia completa de Fra e 9, así como la de sus dos dominios, mediante sucesivas rondas de amplificación por PCR esquematizadas en la figura 11. Los cebadores utilizados en la primera amplificación se diseñaron a partir de secuencias conservadas en β-1,3-glucanasas. La lista de todos los cebadores utilizados se incluye en la Tabla 7.

**TABLA 7.** Cebadores utilizados para la amplificación del cDNA de Fra e 9 mediante PCR y para la clonación de sus dominios

Cebador	Secuencia de nucleótidos		Secuencia de aminoácidos
<b>Fra9.1</b>	5' - TCNTTYATHGGNGTNAAYTAYGG - 3'	Sense	SFIGNVNYG (29-35)
<b>Fra9.2</b>	5' - NGGCCANCCNGTYTCNGCNAC - 3'	Antisense	VAETGWP (262-268)
<b>Fra9.3</b>	5' - GGCTATGGCGATGTGGAGATTGC - 3'	Sense	GYGDVEIA (254-261)
<b>UPM</b>	5' - CTAATACGACTCATAGGGCAAGCAAGCA GTGGTAACAACGCAGAGT - 3'	---	---
<b>Fra9.4</b>	5' - ATGGGAGTTTTCAAAACGACAC - 3'	Sense	MEFSKRH (1-7)
<b>CtD.2</b>	5' - ctg <b>cggccgc</b> TCAAGAGAGGAATGAGCACG - 3'	Antisense	SCSFLS (463-468)
<b>NtD.1</b>	5' - ata <b>catatg</b> ATCGGAGTTAATTACGGC - 3'	Sense	IGVNYG (30-35)
<b>NtD.2</b>	5' - cgg <b>aattc</b> TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGG TTCCTCGCATGATTCCAAC - 3'	Antisense	VGIMRGT (343-349)
<b>CtD.1</b>	5' - tctcga <b>aaaaga</b> GCAGGTGTGCCTGATCAG - 3'	Sense	AGVPDQ (250-256)



**FIGURA 11.** Estrategia de clonación de Fra e 9. Etapas de PCR realizadas con los distintos cebadores (Fra9.1, Fra9.2, Fra9.3, UPM, Fra 9.4, CtD.2, NtD.2, NtD.1 y CtD.1).



La primera etapa de amplificación se llevó a cabo con los cebadores degenerados Fra9.1 y Fra9.2, amplificándose un fragmento interno de 717 nucleótidos. A partir de la secuencia de este fragmento se diseñó Fra9.3, que junto con UPM permitió obtener el resto de la secuencia codificante. El resto de la región 5' se obtuvo utilizando UPM junto con Fra 9.2. Finalmente, para la obtención del cDNA completo se realizó una amplificación con los cebadores Fra9.4 y CtD.2.

Para la amplificación por PCR de los dos dominios se realizó de manera independiente. Para amplificar el dominio N-terminal se utilizaron la pareja de cebadores NtD.1 y NtD.2, que incluían los sitios de restricción *NdeI* y *EcoRI*, respectivamente, destacados en la secuencia que se muestra en la Tabla 7. Para la obtención del dominio C-terminal se utilizaron los cebadores CtD.2, con el sitio de restricción *XhoI*, y CtD.1, con el sitio de restricción *NotI*.

#### **2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Las digestiones de plásmidos se llevaron a cabo durante 2 h a 37 °C, de manera secuencial, en el tampón adecuado para cada enzima de restricción, y utilizando BSA (1 mg/ml) en los casos necesarios según lo indicado por el fabricante. Tras la digestión, las enzimas fueron inactivadas térmicamente mediante la incubación de las muestras a 65 °C durante 10 min.

#### **2.2.6. Aislamiento y clonación de fragmentos de DNA**

Los fragmentos de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (1-2%) y se purificaron según las instrucciones del kit *Wizard PCR Preps* (Promega). Tras su purificación, los fragmentos de DNA se clonaron en el vector pCR2.1 y se transformaron las células TOP10 siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB/Ampicilina (50 ó 100 µg/ml).

La identificación de colonias positivas se realizó mediante lisis de las colonias con 40 µl de tampón de lisis, neutralizando la mezcla con 5 µl de HCl y añadiendo 5 µl de tampón de aplicación de DNA 6X. Las muestras se incubaron durante al menos 20 min a -80 °C y se centrifugaron en frío para facilitar la sedimentación del SDS junto con la mayor parte del DNA cromosómico. Los sobrenadantes conteniendo el DNA plasmídico se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, y se seleccionaron como posibles positivas aquellas colonias que presentaban una disminución en su movilidad electroforética respecto al plásmido sin inserto.

### **2.2.7. Aislamiento de DNA plasmídico**

El aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala ( $\approx 10 \mu\text{g}$ ) se llevó a cabo mediante el GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma), partiendo de cultivos bacterianos de 5 ml de LB. Los aislamientos a gran escala (0.5 mg) se llevaron a cabo con el kit GenElute™ Plasmid Maxiprep, partiendo de 500 ml de cultivo.

## **3. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LA LEVADURA *P. pastoris***

Se produjeron de manera recombinante en la levadura *P. pastoris* las proteínas Ole e 13, CtD-Fra e 9 y CtD-Pers a 9. Las particularidades de cada proceso de producción se indican en la metodología de cada caso.

### **3.1. MATERIALES**

#### **3.1.1. Microorganismos**

**KM71:** *aox1Δ::ARG4 his4 arg4*. En esta cepa el gen AOX1 presenta una delección y ha sido reemplazado con el gen ARG4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

### **3.1.2. Vectores plasmídicos para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris***

**pPICZαA:** plásmido de 3.6 kb que contiene un gen de resistencia a zeocina para la selección de transformantes. Contiene la región promotora y la de terminación de la transcripción del gen AOX1, situándose el sitio múltiple de clonaje entre ambas, lo que permite clonar el gen de interés bajo el control de dicho promotor. A continuación del promotor se encuentra la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, que va a permitir la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular.

### **3.1.3. Medios de cultivo**

**LB bajo en sales:** su composición difiere de la del LB en que este tiene un contenido más bajo de NaCl (0.5% p/v). Se utiliza para el crecimiento de células transformadas de *E. coli* que poseen resistencia al antibiótico zeocina, por verse este inutilizado a alta concentración de NaCl. Para el crecimiento de las células en medio sólido se añadió 15 g/l de agar y 25  $\mu\text{g/ml}$  de zeocina para la selección de transformantes.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo para *P. pastoris*:

**YPD:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 15 g/l de agar (para medio sólido).

**YPDS:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 20 g/l de D-glucosa, 182.2 g/l de sorbitol, 15 g/l de agar (para medio sólido).

**BMGY:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 10 ml/l de glicerol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400  $\mu\text{l/l}$  de biotina, fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

**BMMY:** 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de peptona, 5 ml/l de metanol, 13.4 g/l de base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, 400 µl/l de biotina, fosfato potásico 0.1 M, pH 6.0.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. *Ligación de fragmentos de DNA en pPICZαA y transformación de células competentes DH5α*

La ligación de fragmentos de DNA en el plásmido pPICZαA se realizó utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas) utilizando el tampón indicado para dicha enzima. Las reacciones se incubaron 2 h a temperatura ambiente o bien 16 h a 15 °C. Las células competentes DH5α' fueron incubadas con la mezcla de ligación durante 15 min en hielo, y se transformaron mediante un choque térmico de 4 min a 37 °C y posterior enfriamiento en hielo durante 1-2 min. Se añadieron 800 µl de φ Broth y se incubaron 1 h a 37 °C en baño de agua. Las células se concentraron por centrifugación (200 x g, 5 min) y se crecieron en placas de LB bajo en sal con 25 µg/ml de zeocina.

### 3.2.2. *Transformación de células KM71*

Las células KM71 electrocompetentes se prepararon siguiendo las instrucciones indicadas en manual del fabricante "EasySelect™ Pichia Expression Kit". Se electroporaron con las construcciones derivadas de la ligación del vector pPICZαA con los insertos correspondientes al cDNA codificante de Ole e 13, CtD-Frae 9 y CtD-Pers a 9, linealizando previamente las construcciones con la enzima de restricción *SacI*, *BstXI* y *PmeI*, respectivamente.

El proceso de transformación por electroporación se llevó a cabo en esterilidad incubando en hielo durante 5 min las células KM71 junto con aproximadamente 10 µg del plásmido recombinante linealizado en una cubeta de electroporación (Bio-Rad). Tras secar la cubeta, ésta se sometió a un pulso eléctrico de

25  $\mu$ F, 200 ohmios, 2000 V utilizando un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad). Inmediatamente, se añadió 1 ml de sorbitol 1 M frío y se mantuvieron las células 1.5 h en hielo. Se añadieron 2 ml de YPD y se incubaron durante 2 h a 30 °C. Finalmente, las células se sembraron en placas de YPDS a distintas concentraciones de zeocina (100, 500 y 750  $\mu$ g/ml) para seleccionar los transformantes multicopia, y se incubaron a 30 °C durante 3 días.

### ***3.2.3. Expresión de proteínas recombinantes en células KM71***

Se realizaron primeramente pruebas de expresión de 6-8 colonias transformadas de KM71. Las células se crecieron durante 3 días a 30 °C y 220 rpm en un incubador, en un volumen de 50 ml de BMGY. A continuación las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y fueron resuspendidas cuidadosamente en el medio de inducción BMMY. Estos cultivos se mantuvieron durante 4 días a 30 °C, añadiendo 0.5% de metanol cada 24 h y cogiendo una alícuota diaria para el control de la expresión. Los sobrenadantes recogidos a 0, 24, 48, 72 y 96 h se analizaron por PAGE-SDS y se seleccionó el tiempo óptimo de expresión para cada proteína. Aquellas colonias que mostraron una mejor expresión se eligieron para llevar a cabo las expresiones a gran escala. En el caso de rOle e 13, las células se crecieron en 1 l de BMGY y la inducción se realizó en 200 ml de BMMY.

### ***3.2.4. Purificación de proteínas recombinantes producidas en células KM71***

El sobrenadante de los cultivos se obtuvo por centrifugación de los mismos a 5000 rpm 20 min y se dializó frente a bicarbonato amónico (BA) 20 mM durante 16-18 h a 4 °C. El sobrenadante dializado fue liofilizado y disuelto en bicarbonato amónico 0.2 M, pH 8.0, y aplicado en una columna de Sephadex G-50 Medium o Sephadex G-75 en el caso de rOle e 13. Las fracciones que contenían la proteína se juntaron y liofilizaron. La última etapa de purificación de rOle e 13 y rCtD-Fra e 9 fue una columna de Nucleosil C-18 de RP-HPLC con un gradiente (0-60%) de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoracético (TFA) en 60 min.

En el caso de la expresión del rCtD-Fra e 9 marcado, la purificación se realizó en dos etapas cromatográficas, siendo la primera una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-50 Fine, tras la cual se sometieron las fracciones seleccionadas a una cromatografía de HPLC en fase reversa, empleando el mismo gradiente de acetonitrilo que en la expresión ordinaria de dicha molécula.

## 4. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli*

La expresión recombinante en *E. coli* se llevó a cabo para la obtención del dominio N-terminal de Fra e 9.

### 4.1. MATERIALES

#### 4.1.1. Microorganismos

**BL21-Gold(DE3):** *E. coli* B F<sup>-</sup>ompThsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup>Tet<sup>r</sup>galλ(DE3) endA<sup>H</sup>te.

#### 4.1.2. Vectores plasmídicos para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*

**pET11b:** plásmido de 5.7 kb que contiene un gen de resistencia a ampicilina para la selección de células transformantes. Posee un operón lac entre el promotor del bacteriófago T7 y el sitio de iniciación de la transcripción lo que permite inducir la expresión de nuestra proteína con la adición de IPTG al medio de cultivo.

#### 4.1.3. Medios de cultivo

**LB:** se utiliza para el crecimiento de las células hasta alcanzar una DO 0.9-1.0.

**LB + IPTG:** se añade IPTG al medio de crecimiento LB para inducir la expresión de las células transformantes de *E. coli*.

## 4.2. MÉTODOS

### 4.2.1. *Ligación de fragmentos de DNA en pET11b y transformación de células BL21-Gold(DE3)*

La ligación de fragmentos de DNA en el plásmido pET11b se realizó utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas). La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y se incubó 2 h a temperatura ambiente o bien 16 h a 15 °C. Se transformaron alícuotas de 100 µl de células competentes BL21-Gold(DE3) con aproximadamente 50 ng de DNA de las mezclas de ligación de cada una de las proteínas a expresar. Estas mezclas se incubaron en hielo durante 30 min, y a continuación se facilitó la entrada de DNA mediante choque térmico a 42 °C durante 20 segundos y posterior enfriamiento en hielo durante 2 min. Se añadieron 0.9 ml de SOC precalentado a 42 °C y las reacciones se incubaron a 37 °C en agitación a 220 rpm durante 1 h. Para plaquear las células, éstas se concentraron por centrifugación y se extendieron en una placa de LB con 100 µg/ml de ampicilina. Las placas se mantuvieron en incubador a 37 °C durante 16-18 h.

### 4.2.2. *Expresión de proteínas recombinantes producidas en células BL21-Gold(DE3)*

Para realizar las pruebas de expresión del dominio N-terminal de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de fresno, se seleccionaron varias colonias transformantes de *E. coli*.

Las células transformadas se crecieron en 10 ml de LB con 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una DO de 0.9-1.0, los cultivos se atemperaron a 25 °C y se les añadió IPTG a distintas concentraciones (0.2 mM, 0.4 mM y 0.8 mM). Se cogieron alícuotas a tiempo 0, 2, 4 y 16 h, se centrifugaron y los sedimentos celulares se resuspendieron en Tris-HCl pH 7.4 con 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Las células se lisaron por sonicación con micropunta, se centrifugaron y se analizaron los sobrenadantes y los sedimentos por separado.

La producción a gran escala de rNtD-Fra e 9, se llevaron a cabo con la colonia que en cada caso exhibió mayores niveles de expresión a pequeña escala. En este caso se creció un precultivo de 10 ml de LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml durante 16-18 h a 37 °C, transcurrido este tiempo se volcó el preinóculo en 1 l de LB con ampicilina hasta alcanzar una DO de 0.9-1. La inducción de la expresión se realizó a 25 °C con 0.4 mM IPTG durante 16 h.

#### **4.2.3. Purificación de proteínas recombinantes producidas en células BL21-Gold(DE3)**

Los cultivos celulares se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min y la fracción soluble obtenida se dializó frente a Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 durante 16-18 h a 4 °C. Tras centrifugación, al extracto proteico dializado se le añadió 20 mM de imidazol y se aplicó en la columna de afinidad de níquel HisTrap FF Crude (GE Healthcare Bio-Sciences AB) equilibrada en el mismo tampón de la muestra. La elución de la proteína se llevó a cabo con un gradiente de 20 mM a 0.5 M de imidazol. Las fracciones que contenían la proteína recombinante se juntaron, se liofilizaron y se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico en una columna HiTrap CM FF (GE Healthcare Bio-Sciences AB), donde se utilizó un gradiente de 50 mM a 1 M de acetato sódico pH 5.0 para eluir la proteína.

## **5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROTEÍNAS**

### **5.1. MATERIALES**

#### **5.1.1. Pólenes**

Los pólenes de *Ambrosia trifida*, *Artemisia vulgaris*, *Betula pendula*, *Chenopodium album*, *Cupressus arizonica*, *Dactylis glomerata*, *Eleagnus angustifolia*, *Fraxinus excelsior*, *Juniperus communis*, *Ligustrum vulgare*, *Lolium perenne*, *Olea europea*, *Parietaria judaica*, *Pinus sylvestris*, *Platanus acerifolia*, *Robinia pseudoacacia*,



*Salsola kali*, y *Syringa vulgaris*, fueron suministrados tanto por Allergon AB (Suecia) como por ALK-Abelló (Madrid, España).

#### **5.1.2. Alimentos de origen vegetal**

Otros alimentos de origen vegetal, tales como frutas, verduras, hortalizas y frutos secos, se obtuvieron de comercios locales.

#### **5.1.3. Soluciones de uso general**

**Tampón de transferencia:** Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, 0.0375 % de SDS (p/v) y 20% metanol.

**TBS (Tris-buffered saline):** Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6.

### **5.2. MÉTODOS**

#### **5.2.1. Preparación de extractos proteicos**

Los extractos proteicos de pólenes se prepararon resuspendiendo los granos de polen en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.0 con 1 mM PMSF. Se homogeneizaron utilizando potter de vidrio y la suspensión resultante se sometió a agitación durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se centrifugaron 20 minutos a 10000 rpm y 4 °C. Se recogió el sobrenadante y sobre el sedimento se realizó el proceso de extracción dos veces más. Se juntaron los sobrenadantes y se liofilizaron y conservaron a -20 °C hasta su uso.

Para la obtención de los extractos proteicos de vegetales se procedió primeramente a la deslipidización con acetona (1:5 [w/v]; 1 h, 4 °C x 3) del material de partida liofilizado y pulverizado y se dejó secar durante al menos 24 h a temperatura ambiente. La extracción proteica se realizó por triplicado en PBS con potter, los sobrenadantes obtenidos tras las tres centrifugaciones se dializaron frente a agua y se liofilizaron posteriormente y conservaron a -20 °C hasta su uso.

La extracción proteica de frutos secos se realizó en BA 0.2 M con PMSF 1 mM por triplicado, utilizando potter de vidrio, y los sobrenadantes se liofilizaron. El liofilizado se sometió a deslipidización con acetona tal y como ya se ha descrito. Los extractos se reconstituyeron en bicarbonato amónico 20 mM y liofilizaron y conservaron a -20 °C hasta su uso.

La concentración proteica de todos los extractos fue determinada mediante el método de Lowry.

### **5.2.2. Transferencia electroforética**

La transferencia de proteínas se realizó en membranas de nitrocelulosa (Amersham) según el procedimiento descrito por Towbin [Towbin y col., 1979], tras su electroforesis en PAGE-SDS. Se aplicó una intensidad de corriente de 1 mA/cm<sup>2</sup> durante 1 h, comprobando la eficacia de la transferencia bien mediante patrones de peso molecular de proteínas preteñidas con azul de Coomassie (*Prestained PAGE-SDS Standards, Low Range*; BIO-RAD), o por tinción de las proteínas fijadas en la membrana con Rojo Ponceau, eliminado posteriormente tras sucesivos lavados de la membrana con PBS.

### **5.2.3. Electroforesis bidimensional**

Se realizó esta técnica para la determinación experimental del punto isoelectrico de las proteínas puras, así como para la detección de proteínas concretas en un extracto proteico complejo. Durante la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoelectrico mediante isoelectroenfoque (Protean IEF, Bio-Rad). Las proteínas puras (5 µg) se disolvieron en tampón de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2% (p/v), DTT 50 mM, anfolitos Bio-Lyte® 3/10 0.2% (p/v), Azul de bromofenol 0.001% (p/v)) al que se añadió un 1.5% (v/v) de TBP (tributilfosfina) como agente reductor, para su aplicación en tiras (Bio-Rad) de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de pH 3-10 y 7 cm. El isoelectroenfoque se desarrolló de la siguiente manera: 12 h de

rehidratación activa, 20 min a 250 V, 2 h a 4000 V y voltaje creciente hasta 10000 V. La segunda dimensión se llevó a cabo tras incubar las tiras en tampón de equilibrado I (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M, 20% glicerol, y DTT 2% (p/v)), y II (urea 6 M, SDS 2% (p/v), Tris-HCl (pH 8.8) 0.375 M, 20% glicerol, y DTT 2% (p/v), iodoacetamida 135 mM) y en el tampón de desarrollo de electroforesis. En la segunda dimensión, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS tal y como se ha descrito anteriormente y se detectaron por tinción argéntica o transferencia a membrana e inmunotinción con un anticuerpo policlonal específico o un pool de sueros.

#### **5.2.4. Detección de azúcares**

La detección de proteínas glicosiladas se realizó sobre membranas de nitrocelulosa tras su transferencia a partir de geles de poliacrilamida [Hsi y col., 1991]. Las membranas se incubaron 1 h en tampón de bloqueo (TBS/polivinilpirrolidona 2% (p/v)), y después durante otra hora con Concanavalina A (Con A) biotinilada a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón de bloqueo. La membrana se lava con TBS/Triton X-100 0.1% (v/v) y se incuba 1 h con estreptavidina-HRP (dil. 1:1000). La lectina unida se detectó mediante la reacción de la peroxidasa utilizando 0.3 mg/ml de DAB (3'-diaminobencidina-HCl) en TBS con 0.05% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción se detuvo sumergiendo la membrana en agua destilada.

#### **5.2.5. Espectrometría de masas y secuenciación de proteínas**

La determinación de la masa molecular de proteínas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Las muestras ( $\approx 1 \mu\text{g}$ ) se mezclaron con una disolución saturada de ácido alfa-ciano-4-hidroxicináminco en acetonitrilo acuoso al 30% y se analizaron en un espectrómetro MALDI-TOF-TOF Autoflex III (Bruker).

La secuencia N-terminal de proteínas puras se determinó mediante degradación automática de Edman, en un secuenciador en fase gaseosa AppliedBiosystems modelo 494.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el Servicio de Proteómica y Genómica del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid).

#### **5.2.6. Determinación de características moleculares y búsquedas de homología de secuencia**

*Masa molecular y punto isoeléctrico:* los valores teóricos de masa molecular y punto isoeléctrico de las proteínas se llevaron a cabo empleando el programa ProtParam disponible en el servidor Expasy (<http://www.expasy.org>).

*Predicción de la presencia de un péptido señal:* se utilizó el sistema de predicción facilitado por el servidor SignalP 4.1 basado en modelos de redes neuronales artificiales.

*Predicción de estructura terciaria:* los modelados de la estructura tridimensional de las distintas proteínas se llevó a cabo utilizando el servidor de modelado automático de proteínas SWISS-MODEL, basado en homología de estructura de proteínas, que proporciona el Swiss Institute of Bioinformatics (<http://swissmodel.expasy.org>). Los modelados obtenidos se representaron utilizando el programa PyMol.

*Asignación de potenciales electrostáticos ("modelado de cargas"):* se realizó mediante el programa PyMol en base al modelado 3D realizado con el mismo programa.

*Predicción de epítomos IgE:* se realizó con el servidor Algpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/>).

*Predicción de hidrofobicidad y antigenicidad:* a partir de la secuencia de aminoácidos se obtuvo el perfil de antigenicidad según el método estadístico de Welling y col. [Welling y col., 1985]. La predicción de hidrofobicidad se realizó según el programa descrito por Kyte y Doolittle [Kyte y col., 1982].

*Búsqueda de homología de secuencias y alineamiento de proteínas homólogas:* la búsqueda de proteínas homólogas se llevó a cabo mediante BLAST. Los alineamientos de secuencia de aminoácidos se realizaron utilizando el programa CLUSTALW.

## 6. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE PROTEÍNAS

### 6.1. MÉTODOS

#### 6.1.1. Espectros de absorción ultravioleta

Los espectros de absorción ultravioleta se realizaron en cubetas de paso óptico 0.1-1 cm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7.

#### 6.1.2. Cálculo del coeficiente de extinción

El coeficiente de extinción molar a 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) se calculó de manera teórica a partir de la ecuación [Wetlaufer, 1962]:

$$\epsilon_{280} = n^{\circ}\text{Tyr} \times \epsilon_{\text{Tyr}} + n^{\circ}\text{Trp} \times \epsilon_{\text{Trp}} + n^{\circ}\text{Cys-Cys} \times \epsilon_{\text{Cys-Cys}}$$

Dónde:

$$\epsilon_{\text{Tyr}} = 1340 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Trp}} = 5540 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{\text{Cys-Cys}} = 150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

#### 6.1.3. Análisis espectroscópico por dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular (DC) en el UV-lejano fueron registrados con un espectropolarímetro Jasco J-715 (Japan Spectroscopic Co.) con la configuración descrita por el hardware P/N manual de Jasco: 0302-0265A según lo descrito previamente [Verdino y col., 2008]. Las proteínas fueron preparadas en 0.2 mg/ml en

tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0. Los espectros fueron medidos en una cubeta cilíndrica con un paso óptico de 0.1 cm. Las elipticidades molares por residuo (grados  $\times$   $\text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ ) se calcularon en base al peso molecular medio por aminoácido obtenido a partir de la composición aminoacídica de cada proteína. La elipticidad molar por residuo se calculó a partir de la elipticidad registrada, según:

$$[\theta]_{\text{MWR}} = 3300 \times S \times H \times \text{MWR}/l \times c$$

Siendo:

$[\theta]_{\text{MWR}}$ : elipticidad molar por residuo.

S: sensibilidad de detección del aparato.

H: diferencia en mm entre la línea base y el espectro de la muestra.

MWR: peso molecular medio por aminoácido.

l: paso óptico en cm.

c: concentración de proteína en mg/ml.

Los espectros de dicroísmo en presencia de laminarina se realizaron para rCtD-Fra e 9 en las mismas condiciones añadiendo laminarina a una concentración final de 0.2 mg/ml.

#### **6.1.4. Curvas de desnaturalización térmica**

El cálculo de la temperatura de desnaturalización de las proteínas se llevó a cabo mediante la realización de las curvas de desnaturalización térmica. Para ello, el dicrógrafo se conectó a un baño Neslab RTE-111 que controló la temperatura de la cubeta. Se registraron los cambios en la elipticidad molar a 220 nm, o 225 nm en el caso de rOle e 13, en un rango de temperaturas entre 20 °C y 85 °C, con un incremento de 1 °C/min. Para estas mediciones se utilizaron cubetas cilíndricas de paso óptico 0.1 cm y una concentración de proteína en torno a 0.2 mg/ml en tampón fosfato sódico 50 mM, pH 7.0.

## 7. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS

### 7.1. MATERIALES

#### 7.1.1. *Microorganismos*

Se utilizaron para los ensayos de actividad antifúngica los siguientes hongos: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus flavus*.

#### 7.1.2. *Reactivos*

**PDA:** medio de patata/dextrosa/agar.

**Reactivo de Somogyi:** 24 g/l de carbonato sódico anhidro, 12 g/l de tartrato sódico potásico, 4 g/l de sulfato cúprico hidratado, 16 g/l de bicarbonato sódico, 180 g/l de sulfato sódico anhidro. El reactivo preparado se mantuvo una semana en oscuridad a 37 °C hasta su utilización.

**Reactivo de Nelson:** 25 g/l de molibdato amónico hidratado, 21 ml de ácido sulfúrico concentrado, 3 g/l de arseniato bisódico. El reactivo se guarda en frasco de topacio, protegido de la luz, y se mantiene a 37 °C durante 48 h.

**Tampón de electroforesis sin SDS:** Tris-base 25 mM, glicina 192 mM.

**Carbohidratos:** Laminarina de *Laminaria digitata*, lichenan de *Cetraria islandica* (Sigma) y Carboximetil-celulosa (CM-celulosa); laminarinahexaosa y laminarinatetraosa (Megazyme); agarosa (Conda labs.).

## 7.2. MÉTODOS

### 7.2.1. Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de rOle e 13 y de rNtD-Fra e 9 se llevó a cabo mediante un ensayo de inhibición de crecimiento de distintos hongos en placa de PDA. Para ello se utilizaron 25 µg de las proteínas purificadas, depositados en el centro de discos de papel de filtro Whatman estériles distribuidos a la misma distancia del centro de cada una de las placas en las que previamente se habían sembrado los hongos. Como control negativo se utilizó el tampón de resuspensión de las proteínas y las placas se incubaron a 28° C durante 5 días.

### 7.2.2. Actividad enzimática $\beta$ -1,3-glucanasa

La determinación de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la medida de los equivalentes de glucosa reducidos liberados durante la reacción enzimática [Nelson, 1944; Somogyi, 1952].

Para los ensayos enzimáticos, se utilizó la enzima a distintas concentraciones en tampón acetato sódico 50 mM a pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y tampón fosfato sódico 50 mM a pH 7.0, 7.5 y 8.0, conteniendo albúmina de suero bovino (BSA) a 0.4 mg/ml. A esta solución se le añadió el sustrato, laminarina del microorganismo *Laminaria digitata* (Sigma) a una concentración final de 2 mg/ml y se incubó a 37 °C durante distintos tiempos. La reacción se paró añadiendo 100 µl del reactivo Somogyi, tras lo cual se incubaron las muestras a 100 °C en baño de agua durante 15 min. El desarrollo del color se consiguió añadiendo 100 µl del reactivo Nelson. Por último, a la mezcla de reacción se le añadió agua destilada hasta completar el volumen a 1 ml y se realizaron las mediciones de absorción a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-7. En todos los ensayos se construyó una recta patrón con una solución de glucosa.



### **7.2.3. Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes y electroforesis en geles de afinidad (AGE) en presencia de carbohidratos**

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo descrito para PAGE-SDS pero omitiendo la adición de SDS tanto en los geles como en el tampón de electroforesis y en el tampón de aplicación de las muestras.

Las proteínas (2.5 µg) fueron sometidas a electroforesis en geles al 15% de poliacrilamida. Estos se polimerizaron en presencia de distintos oligo/polisacáridos a distintas concentraciones (0.25 mg/ml a 5 mg/ml), que fueron añadidos a la mezcla del gel antes de su polimerización. Los geles sin ligando se corrieron paralelamente durante 1 h a 25 mA por gel. La BSA (0.7 µg) fue utilizada como control negativo. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie y sus movilidades electroforéticas relativas se midieron desde la parte superior del gel separador.

## **8. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE PROTEÍNAS**

### **8.1. MATERIALES**

#### **8.1.1. Sueros**

Para el estudio de Ole e 13 se utilizaron sueros de pacientes procedentes del Complejo Hospitalario de Jaén, cedidos por el Dr. Joaquín Quiralte de la Unidad de Alergia del Hospital Ciudad de Jaén (n=1, paciente J; y un pool de 10 sueros de los pacientes alérgicos al polen de olivo, JP), y del Hospital Clinic de Barcelona, cedidos por el Dr. Joan Bartra (n=2, pacientes B1 y B2). El paciente J (edad 41) mostraba una historia clínica de la alergia ocupacional a la harina de la aceituna molturada. Los pacientes alérgicos al polen de olivo presentaban RAST >3 a extracto y cumplían los criterios siguientes: i) rinitis estacional y/o asma bronquial de finales de abril a junio; ii)

la prueba cutánea positiva al extracto del polen de *Olea europaea* (ALK-Abelló, Madrid, España); iii) niveles elevados de IgE específica a este polen que fueron determinados por ELISA y iv) no haber sido sometidos a tratamiento de inmunoterapia frente al polen de olivo. Los pacientes B1 y B2 sufrieron anafilaxia al ingerir aceituna y eran moderadamente polínicos. Por otro lado, 36 sueros de pacientes de Madrid cedidos por la Dra. Cristina Pascual del Hospital Universitario Infanta Sofía de San Sebastián de los Reyes, con IgE frente a alimentos vegetales, fueron utilizados también en la caracterización de rOle e 13.

### **8.1.2. Anticuerpos**

Los anticuerpos policlonales frente a rNtD y rCtD-Fra e 9 fueron producidos por el Dr. Fernando Vivanco en la Fundación Jiménez Díaz de Madrid. La obtención de los mismos se llevó a cabo mediante la inmunización de conejos New Zealand con 100 µg de las proteínas puras junto con adyuvante de Freund, en un total de 4 inmunizaciones realizadas con periodicidad semanal.

El anticuerpo policlonal frente a Ole e 13 se obtuvo inmunizando intraperitonealmente ratones hembra tipo BALBc de 6 a 8 semanas de edad con 1 µg de proteína incubada previamente 1 h con hidróxido de aluminio [Sirvent y col., 2011]. Se realizaron un total de 5 inmunizaciones con periodicidad semanal y transcurridos 35 días se obtuvo el suero inmune.

El anticuerpo policlonal de cabra frente a IgG de conejo (GAR) y el de conejo frente a IgG de ratón (RAM) conjugados con peroxidasa, fueron suministrados por Bio-Rad y Dako, respectivamente. Las diluciones utilizadas de los anticuerpos fueron de 1:3000 y 1:2000, respectivamente.

El anticuerpo monoclonal específico anti-IgE humana fue producido y cedido amablemente por los laboratorios ALK-Abelló de Madrid. La dilución utilizada para todos los ensayos fue de 1:5000.

## 8.2. MÉTODOS

### 8.2.1. *Enzimoimmunoensayo (ELISA) indirecto*

Todos los ensayos se llevaron a cabo en placas Costar de 96 pocillos de fondo plano y de alta capacidad de unión. Para cada punto se realizó al menos un duplicado.

Se tapizaron las placas con 100 µl por pocillo de una disolución del antígeno (1-0.5 µg/ml) en PBS, pH 7.2, incubándose a 4 °C durante 12-16 h. A continuación, tras 4 lavados de los pocillos con PBS/Tween-20 0.5% se bloquean los sitios de unión inespecíficos con 200 µl de tampón de bloqueo (PBS/Tween-20 0.1%/leche en polvo 3%) durante 1 h a 37 °C. Después se incubaron las placas 2 h con los sueros de pacientes o 1 h con el anticuerpo primario, diluidos en tampón de bloqueo (100 µl/pocillo). Tras un nuevo lavado, se incubaron las placas durante 1 h con el segundo anticuerpo (100 µl/pocillo) en tampón de bloqueo diluido a la mitad con PBS. Para el suero de conejo se usó como segundo anticuerpo una dilución 1:3000 de GAR-HRP, para los anticuerpos monoclonales se utilizó una dilución 1:2500 de RAM-HRP y en el caso de sueros de pacientes alérgicos se empleó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana obtenido en ratón (1:5000). En este último caso, se realizó una posterior incubación con RAM-HRP (rabbit anti-mouse, 1:2000) (1 h a 37 °C). Las placas se lavaron nuevamente y se procedió al revelado de las mismas con o-fenilendiamina (OPD, 0.63 mg/ml) disuelto en citrato sódico 0.1 M, pH 5.0, con 4% de metanol y un 0.032% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µl/pocillo). La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 3 N. La medida de densidad óptica de cada pocillo a 490 nm se realizó en un lector de ELISA iMark<sup>TM</sup> Microplate Reader (Bio-Rad). Se realizó un control negativo sin anti-IgE cuyo valor de DO se sustrajo de los valores de DO obtenidos para las distintas muestras.

### 8.2.2. *Ensayos de inhibición*

Se preincubaron mezclas de anticuerpo o suero junto con distintas diluciones del antígeno que se quería usar como inhibidor, bien proteína pura o extractos

proteicos, durante 2 h en agitación suave a temperatura ambiente. Tras ese tiempo se añadieron a los distintos pocillos previamente tapizados y saturados según el procedimiento descrito en el apartado anterior. A continuación se incubó la placa durante 1 h (ó 2 h en el caso de la unión de IgE) a 37 °C y se continuó de forma idéntica a la descrita en el ELISA de titulación.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición frente a concentración de inhibidor, estimándose de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 [1 - (DO_{\text{obs}} - DO_{\text{blanco}}) / (DO_{\text{max}} - DO_{\text{blanco}})]$$

Siendo:

$DO_{\text{obs}}$ : Densidad óptica a 490 nm en presencia de inhibidor.

$DO_{\text{blanco}}$ : Densidad óptica a 490 nm tapizando los pocillos con PBS en lugar del alérgeno.

$DO_{\text{max}}$ : Densidad óptica a 490 nm en ausencia de inhibidor.

Se realizaron también ensayos de inhibición en immunoblotting siguiendo el mismo procedimiento que en ELISA, pero sustituyendo la placa multipocillos por membrana de nitrocelulosa en la que se transfirieron los distintos alérgenos. Los porcentajes de inhibición se calcularon con el programa Multi Gauge V3.0 tomando como referencia de 100% de la señal la obtenida en la muestra sin inhibir.

### **8.2.3. Inmunodetección de proteínas transferidas a membrana de nitrocelulosa**

Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, ésta se incubó 1 h a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Se añadió después el suero o anticuerpo diluido en el mismo tampón y se incubó 1 h (2 h en el caso de sueros de pacientes alérgicos) a temperatura ambiente. Después de lavar la membrana con PBS/Tween-20 0.1%, se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. En el caso de la detección de IgE, y al

igual que en ELISA, fue necesaria una incubación adicional con RAM-HRP. Tras los lavados se procedió al revelado de la membrana por el método del ECL (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las inhibiciones en este caso se realizaron por el mismo procedimiento que en ELISA, partiendo de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa.



# **1. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Results and discussion**





## PRIMERA PARTE. Taumatina natural y recombinante de aceituna: alergia ocupacional e implicación en reactividad cruzada

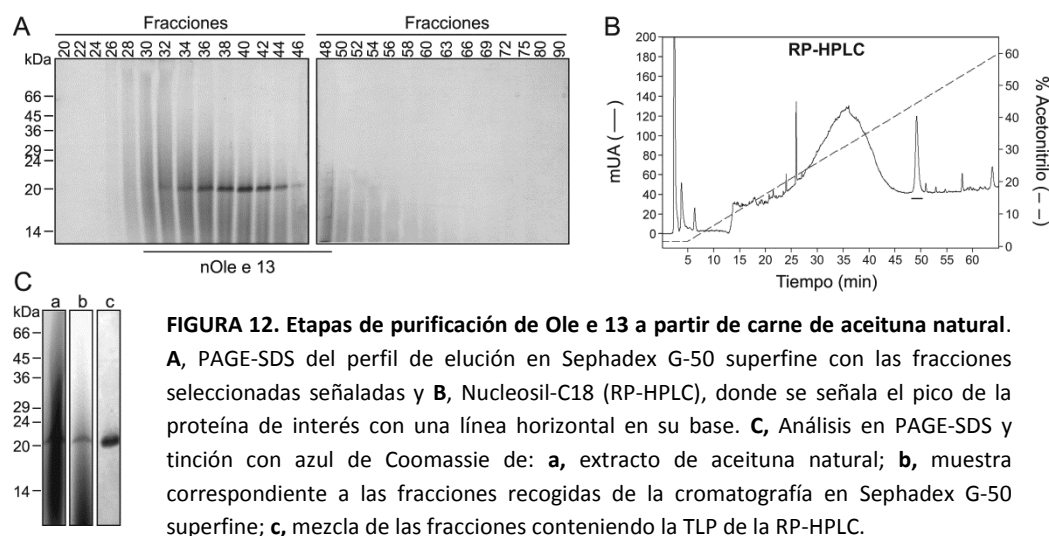
---

Las reacciones alérgicas a alimentos de origen vegetal representan una de las alergias alimentarias más frecuentes en adultos [Chaudhry y col., 2012]. En la dieta mediterránea se utilizan frecuentemente derivados de la aceituna, siendo los principales el aceite de oliva y las aceitunas comestibles. La obtención de ambos productos alimenticios implica el procesamiento de la aceituna natural, que entre su componente proteico contiene una proteína tipo taumatina (TLP). Dicha proteína, Ole e 13, ha sido descrita como el agente responsable del asma ocupacional inducido por la inhalación de partículas derivadas de la molturación de las aceitunas en el trabajador de una almazara en Jaén [Palomares y col., 2008]. A pesar del amplio consumo en la dieta mediterránea, tanto de la aceituna *per se* como del aceite de oliva u otros productos derivados, la alergia a aceituna ha sido descrita en contadas ocasiones. En los casos reportados, la alergia se ha atribuido a la sensibilización por la propia ingesta de aceituna [Azofra, 2004; Enríquez-Matas y col., 2007; Williams y col., 2007; Álvarez-Eire y col., 2012], a la exposición condicionada al polen de olivo [Ünsel y col., 2009] o al tratamiento con inmunoterapia frente a pólenes [Feo Brito y col., 2011]. En cuanto a la alergia al aceite de oliva, la mayoría de los casos han sido asociados con alergia ocupacional, en la que los pacientes presentan eczema por contacto con el aceite en el lugar de trabajo [de Boer y col., 1984; Malmkvist Padoan y col., 1990; Isaksson y col., 1999; Wong y col., 2004]. En ninguno de estos casos fueron identificadas las moléculas responsables del desarrollo de los procesos alérgicos, siendo Ole e 13 el único alérgeno descrito en aceituna hasta la fecha [Palomares y col., 2008].

## 1. AISLAMIENTO DE LA TLP DE ACEITUNA Y ESTUDIO DE SU IMPLICACIÓN EN LA ALERGIA OCUPACIONAL

### 1.1. Aislamiento y purificación de la TLP de aceituna natural

Para poder estudiar la implicación de Ole e 13 en la alergia a aceituna se procedió a la purificación de esta proteína. Para llevar a cabo dicho proceso se requirió de una primera fase de deslipidización de un homogenizado de la carne de aceituna natural de la variedad manzanilla previamente liofilizada, tras la cual se realizó una extracción acuosa de las proteínas, siguiendo el protocolo descrito previamente [Palomares y col., 2008] con ligeras modificaciones. La primera etapa de purificación consistió en una cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-50 superfine, cuyas fracciones eluídas se sometieron directamente a PAGE-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie (FIG. 12A). Con esta etapa se eliminaron parcialmente pigmentos así como posibles proteínas minoritarias.



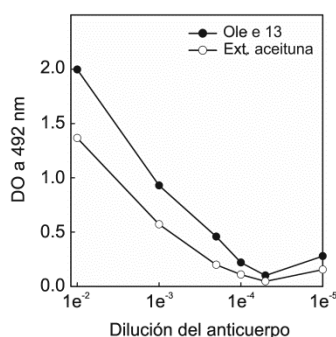
**FIGURA 12. Etapas de purificación de Ole e 13 a partir de carne de aceituna natural.**

**A**, PAGE-SDS del perfil de elución en Sephadex G-50 superfine con las fracciones seleccionadas señaladas y **B**, Nucleosil-C18 (RP-HPLC), donde se señala el pico de la proteína de interés con una línea horizontal en su base. **C**, Análisis en PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie de: **a**, extracto de aceituna natural; **b**, muestra correspondiente a las fracciones recogidas de la cromatografía en Sephadex G-50 superfine; **c**, mezcla de las fracciones conteniendo la TLP de la RP-HPLC.

Las fracciones seleccionadas de esta etapa cromatográfica se sometieron a un último paso de purificación, en RP-HPLC en una columna Nucleosil-C18, y utilizando para su elución un gradiente de acetonitrilo (0-60%) en TFA 0.1% (v/v) (FIG. 12B). El análisis en PAGE-SDS de la proteína purificada tras las distintas etapas cromatográficas se muestran en la figura 12C.

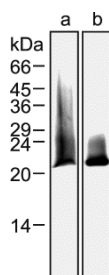
## 1.2. Titulación del anticuerpo policlonal anti-Ole e 13

El título de los anticuerpos policlonales obtenidos tras la inmunización de los ratones BALBc con Ole e 13 pura, según el protocolo descrito en Materiales y Métodos, fue evaluado tanto para Ole e 13 como para el extracto proteico de carne de aceituna en ELISA (FIG. 13). El título del anticuerpo policlonal obtenido se estableció en una dilución óptima de 1:500 para los sucesivos inmunoensayos.



**FIGURA 13. Curvas de titulación en ELISA del anticuerpo policlonal anti-Ole e 13.** Se utilizaron Ole e 13 natural purificado y extracto de aceituna.

El anticuerpo policlonal se ensayó también mediante una inmunotinción frente a Ole e 13 y al extracto de aceituna transferidos a membrana (FIG. 14), observándose una única banda proteica de alrededor de 22 kDa correspondiente a la TLP.

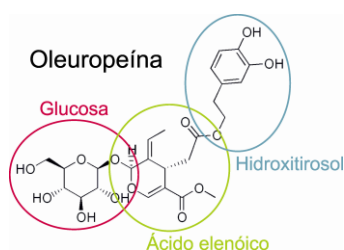


**FIGURA 14. Inmunotinción de Ole e 13 y extracto de carne de aceituna con pAb anti-Ole e 13.** Se utilizó una dilución 1:500 del pAb anti-Ole e 13. **a**, inmunotinción de extracto de aceituna (40 µg); **b**, inmunotinción de Ole e 13 (1 µg).

### 1.3. Efecto del procesamiento de la aceituna sobre el contenido e integridad de la TLP

La falta de correspondencia entre el elevado consumo de aceituna y su escasa prevalencia en alergia nos llevó a explorar las diferencias en el contenido e integridad de TLP entre la aceituna natural y la comestible.

Las aceitunas comestibles son sometidas a un exhaustivo tratamiento de maceración para hacerlas aptas para el consumo. Este tratamiento se basa fundamentalmente en la utilización de sosa durante al menos 24 h para la eliminación de la oleuropeína (FIG. 15), un componente fenólico mayoritario de la pulpa de las aceitunas que les confiere su característico sabor amargo.

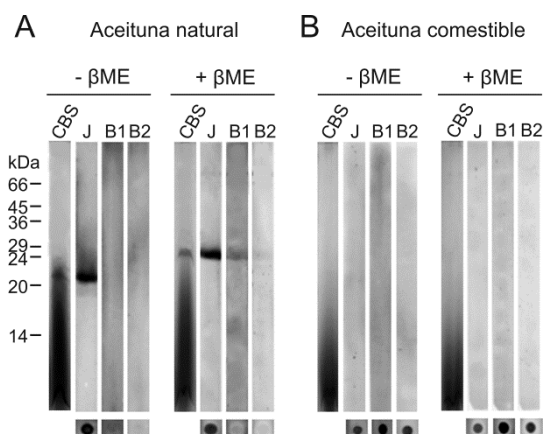


**FIGURA 15. Estructura química de la oleuropeína.**  
Se indican los distintos componentes de la molécula.

Para poder estudiar las particularidades de la aceituna comestible en cuanto a su contenido proteico y alergenicidad, en comparación con la aceituna natural, se utilizó extracto proteico de aceituna comestible comercial (variedad manzanilla), así como extracto de aceituna manzanilla natural sometida a un proceso de maceración. Este macerado se llevó a cabo también con el alérgeno Ole e 13 puro, siguiendo en ambos casos el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

Se realizó un primer análisis mediante PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie del contenido proteico de los extractos de aceituna natural y comestible, el cual mostró una pérdida significativa de proteínas en esta última (FIG. 16A y B, carriles CBS), tanto en las muestras sin tratar como en las tratadas con un agente reductor ( $\beta$ ME). Este ensayo coincide con los datos publicados que destacan una proteína

alergénica de alrededor de 22 kDa como la mayoritaria en pulpa de aceituna [Palomares y col., 2008; Esteve y col., 2011]. La proteína de 22 kDa, Ole e 13, que aparece en la aceituna natural no es detectable en la comestible.



**FIGURA 16. Análisis en PAGE-SDS de la reactividad de IgEs de pacientes alérgicos frente a la aceituna natural y la aceituna comestible.** A, Extracto de aceituna natural y B, aceituna comestible (200 µg por carril) tras PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie (CBS) o transferencia a membranas e inmunotinción con los sueros J, B1 y B2, en ausencia (-) o presencia (+) de β-ME. En la parte inferior se muestra el análisis por aplicación directa de 10 µg de proteína total de los dos extractos en las distintas condiciones.

Se utilizaron tres sueros de pacientes alérgicos a la aceituna para los ensayos de inmunotransferencia (FIG. 16). Se trata de un suero de un paciente sensibilizado a la aceituna por inhalación (suero J) y dos pacientes alérgicos a la aceituna por ingestión (sueros B1 y B2), cuyos datos clínicos vienen detallados en Materiales y Métodos. La TLP de aceituna natural es reconocida por el suero del paciente J, y aunque se trata de una proteína rica en puentes disulfuro en su estructura nativa, prácticamente no hay pérdida de reactividad cuando se trata la muestra con βME (FIG. 16A). Sin embargo, los pacientes B1 y B2, sensibilizados a aceituna comestible ingerida, reaccionan sólo a la aceituna natural en condiciones reductoras y además de manera poco intensa. Esto podría deberse a exposición de epítomos continuos por la reducción de los puentes disulfuro de la proteína, que serían reconocidos por los

pacientes B1 y B2 además de por el paciente J. El distinto comportamiento de los tres sueros puede deberse a la diferente vía de sensibilización a la aceituna entre el paciente J y los pacientes B. Estos últimos están sensibilizados a diversos alimentos vegetales -como manzana, melocotón o kiwi- en los que se han descrito TLPs alergénicas. Cuando se aplicaron las mismas muestras directamente sobre membrana de nitrocelulosa -en condiciones no reductoras-, el reconocimiento de las IgE del suero J permanece inalterado, mientras que los sueros B1 y B2 no muestran esta vez señal positiva, lo cual podría deberse a que la disposición de las moléculas en la membrana ocultasen el/los epítipo/s reconocido/s por las IgE de los sueros B1 y B2.

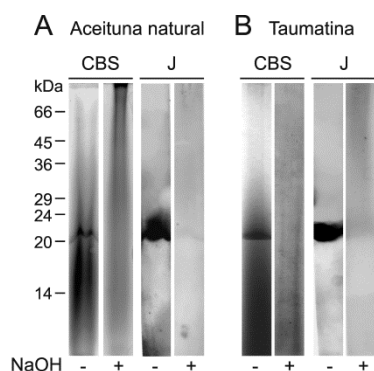
Cuando se realizaron los mismos ensayos con aceituna comestible no se detectó señal en ninguna de las condiciones de la inmunotinción tras electroforesis (FIG. 16B). Sin embargo, en la tinción de las proteínas de ambos tipos de aceituna tras aplicación directa los tres sueros son reactivos en todas las condiciones ensayadas, a pesar de que en la tinción con azul de Coomassie no se reconoce ninguna banda. Estos datos podrían explicarse por la presencia, en las aceitunas comestibles, de péptidos con epítopos IgE lineales, resultantes de la maceración de las aceitunas; o, por otro lado, los pacientes podrían estar sensibilizados a componentes utilizados en el proceso de condimentación de las mismas.

#### **1.4. Tratamiento de Ole e 13 y de la aceituna natural con sosa**

Ole e 13 pura fue disuelta en 0.25 M NaOH, utilizándose la misma concentración de solvente que en la maceración de las aceitunas crudas. Transcurridas 24 h, las aceitunas se dializaron exhaustivamente frente a agua para posteriormente poder realizar la extracción proteica siguiendo el protocolo habitual, y la muestra de Ole e 13 tratada se liofilizó y reconstituyó en tampón de aplicación. Ambas muestras se sometieron a electroforesis en PAGE-SDS y se visualizaron tanto con azul de Coomassie como mediante inmunotinción con el suero J de las proteínas transferidas

a membrana (FIG. 17). La unión de IgE desaparece en ambos casos tras el tratamiento con NaOH.

Las TLP son proteínas que, en muchas ocasiones, presentan carácter antifúngico y que pertenecen a la familia 5 de proteínas relacionadas con patogénesis (PR-5) [Wagner y col., 2004]. Se trata de proteínas generalmente resistentes a proteólisis y a desnaturalización por temperatura o condiciones extremas de pH [Smole y col., 2008]. Sin embargo, un tratamiento prolongado de estas proteínas con una base fuerte como la sosa provoca su degradación, probablemente por hidrólisis, y la consecuente pérdida del reconocimiento por parte de las IgE (FIG. 17). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el experimento de la figura 16 con las aceitunas de la variedad manzanilla.

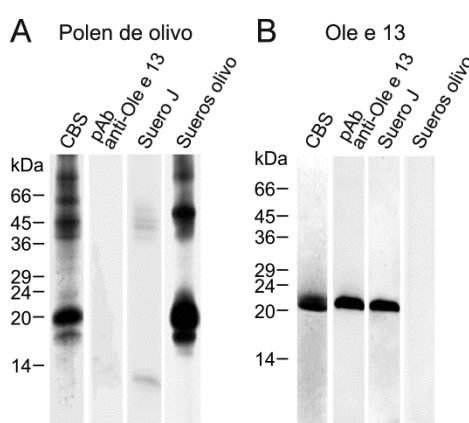


**FIGURA 17. Análisis de la presencia y reactividad de Ole e 13 frente a IgE tras el tratamiento con NaOH.** A, Resultados obtenidos con la aceituna natural y B, con la molécula Ole e 13 pura. Tinción con azul de Coomassie Blue (carriles CBS) e inmunotinción con el suero J (carril J) tras electroforesis en PAGE-SDS de las muestras con (+) o sin (-) tratamiento con 0.25 M NaOH.

### 1.5. Análisis de la presencia de TLP en polen de olivo y de la reactividad entre polen de olivo y aceituna a través de Ole e 13

El polen de olivo es una causa frecuente de hipersensibilidad inmediata de Tipo I [Liccardi y col., 1996] en áreas geográficas como la costa mediterránea, ciertas zonas de América (California, Chile y Argentina), Australia y Sudáfrica. Se han identificado y caracterizado doce alérgenos en polen de olivo, con diferente significancia clínica, desde muy alta como es el caso de Ole e 1 a muy baja como ocurre con Ole e 8 [Rodríguez y col., 2001; Rodríguez y col., 2002; Villalba y col., 2013].

Para establecer si la taumatina de aceituna está presente en polen de olivo se realizó un ensayo de inmunodetección en membrana. Utilizando el suero del paciente J, se apreció la total ausencia de reacción en el extracto de polen de olivo a la altura de  $\approx 22$  kDa que correspondería a una TLP (FIG. 18A), mientras que con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a este polen, diversas proteínas dieron respuesta positiva (FIG. 16A). Además, el anticuerpo policlonal específico frente a Ole e 13 tampoco reconoció ninguna proteína en el extracto de polen de olivo (FIG. 18A).



**FIGURA 18. Análisis de la presencia de TLP en extracto de polen de olivo.** A, Tinción con azul de Coomassie (CBS) e inmunodetección del extracto de olivo (40  $\mu$ g) con el anticuerpo anti-Ole e 13 y con el suero del paciente J así como con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. B, Mismas tinciones que en A pero para Ole e 13 (1  $\mu$ g).

Por otro lado, se analizó si una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo con altos niveles de IgE era capaz de reconocer a la TLP purificada de aceituna, teniendo como referencia el reconocimiento de este alérgeno por el suero J. El resultado de la inmunodetección con los pacientes alérgicos al polen de olivo fue negativo para la TLP (FIG. 18B), lo que apoya el hecho de que la taumatina Ole e 13 no parece ser una proteína alergénica en polen de olivo.

Las TLP de plantas se encuentran principalmente en frutos, sin embargo la vía de acceso de los alérgenos puede variar. El desarrollo de alergias ocasionado por inhalación de harinas derivadas de alimentos vegetales molidos no es infrecuente.



Por ejemplo, el polvo derivado de semillas de soja, o las harinas de cereales como el trigo, provocan asma y están implicados frecuentemente en procesos de alergia ocupacional como es el “Asma del panadero” [Quirce y col., 2006; Palacín y col., 2007; Salcedo y col., 2011]. En concreto, la TLP ha sido descrita en trigo, concretamente en harinas, como un alérgeno relevante en la alergia respiratoria de los panaderos [Lehto y col., 2010]. Sin embargo la TLP no parece estar presente en el polen de olivo ya que los epítomos de esta molécula no son detectados ni por IgG específicas ni por el suero de pacientes alérgicos al polen de olivo con elevado título de IgE total a dicho polen y por tanto no es un alérgeno del polen de olivo, que es sin embargo una importante fuente de aeroalérgenos.

En resumen, nuestros resultados indican que la población de pacientes que presentan hipersensibilidad al polen de olivo no sería susceptible de manifestar reacciones alérgicas a la aceituna a través de reactividad cruzada provocada por Ole e 13, ni por TLPs de otras fuentes alergénicas.

## **2. PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DE rOle e 13**

### **2.1. Clonación y secuenciación del DNA codificante de Ole e 13**

Para determinar la secuencia completa de Ole e 13 se partió de la secuencia ATFXIVNQXTYTVXAAASP, correspondiente al péptido obtenido por degradación de Edman de la TLP de aceituna sin procesar [Palomares y col., 2008]. Este fragmento presenta gran similitud con el extremo N-terminal de diversas TLPs (TABLA 8).

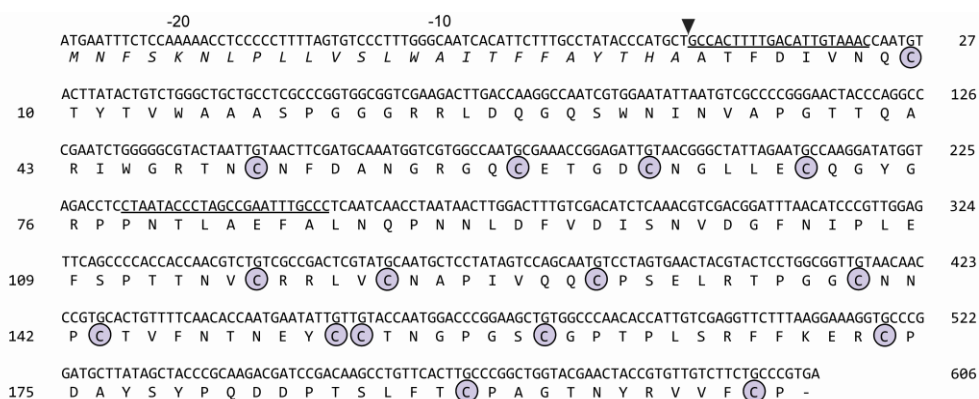
A partir de la secuencia obtenida se diseñó un primer cebador para clonar la proteína de aceituna. Se necesitaron 3 etapas de amplificación por PCR para la obtención de la secuencia completa, para lo cual se utilizó como molde el cDNA total

de carne de aceituna obtenido a partir de retrotranscripción de su RNA total, como se indica en Materiales y Métodos, y utilizando los cebadores que allí se mencionan.

**TABLA 8. Comparación de la secuencia N-terminal de Ole e 13 con la de otras TLPs.** Los aminoácidos en negrita de la secuencia de Ole e 13 indican los residuos idénticos en todas las secuencias comparadas.

Proteína	Secuencia N-terminal	Fuente biológica
<b>Ole e 13</b>	<b>ATFXIVNQXTY<b>YTV</b>XAAASP</b>	<i>Olea europaea</i> (aceituna)
<b>Act d 2</b>	ATFDIVNQCTYTVWAAASP	<i>Actinidia deliciosa</i>
<b>TLP E22</b>	ATFDIVNKCTYTVWAAASP	<i>Nicotiana tabacum</i>
<b>Precursor de osmotina</b>	ATFDVVRCTYTVWAAASP	<i>Ricinus communis</i>
<b>OSM34</b>	ATFEILNQCSYTVWAAASP	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>TLP</b>	ATFDIVNRRSYTVWAAASP	<i>Sambucus nigra</i>
<b>VVTL1</b>	ATFDILNKCTYTVWAAASP	<i>Vitis vinifera</i>
<b>Cry j 3.1</b>	ATFDITNQCPYTVWAAASP	<i>Crytomeria japonica</i>
<b>TLP</b>	ATFAVLNKCTYTVWAAASP	<i>Camellia sinensis</i>
<b>Taumatina II</b>	ATFEIVNRCSYTVWAAASP	<i>Thaumatococcus daniellii</i>
<b>Mus a 4</b>	ATFEIVNRCSYTVWAAAVP	<i>Musa acuminata</i>

Se secuenciaron 5 clones y no se observó variabilidad entre ellos en cuanto a la secuencia aminoacídica. La figura 16 muestra la secuencia completa de nucleótidos del cDNA de Ole e 13, junto con la secuencia de aminoácidos deducida. La región codificante consta de 678 nucleótidos que codifican 226 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 24 residuos, deducido mediante el sistema de predicción del servidor SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La pérdida de dicho péptido durante la maduración postraducciona de la proteína natural viene confirmada por la secuencia N-terminal obtenida experimentalmente. La presencia de un péptido señal es característica tanto de TLPs de plantas como de animales [Liu y col., 2010]. La masa molecular deducida de la secuencia de aminoácidos de la proteína madura de 202 residuos es 21959.3 Da, y su punto isoeléctrico teórico 4.76. La molécula exhibe un patrón de 16 cisteínas equivalente al que presentan otras TLPs. A diferencia de otros miembros de esta familia, Ole e 13 no posee en su secuencia sitios consenso de N-glicosilación.



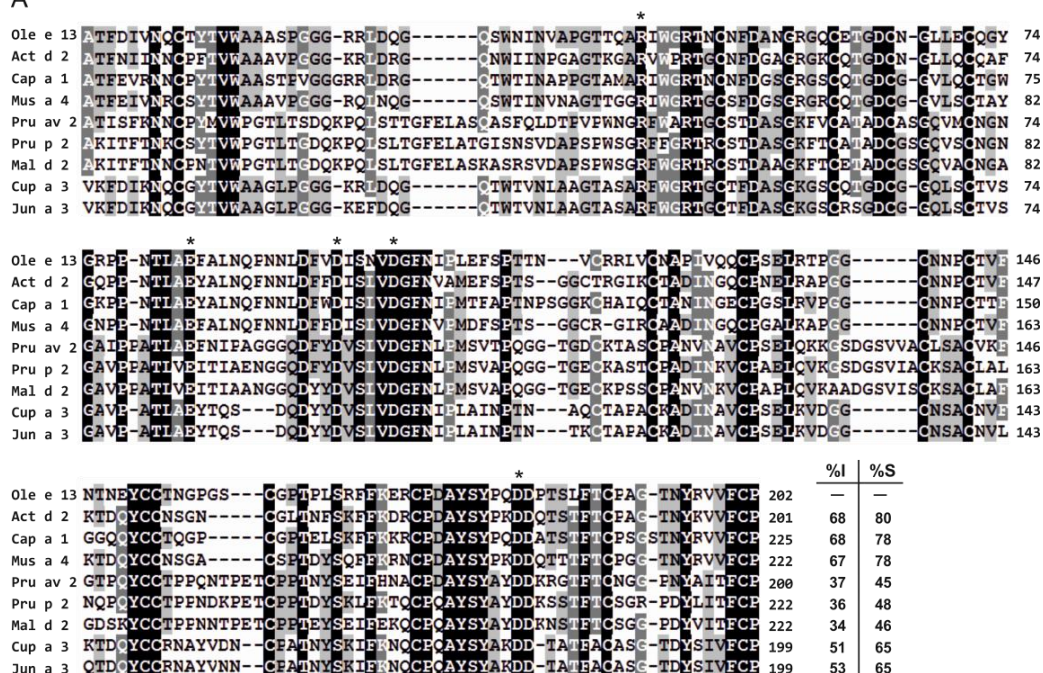
**FIGURA 19. Secuencia de nucleótidos de Ole e 13 y secuencia de aminoácidos deducida.** El péptido señal se indica en cursiva. El sitio de procesamiento se presenta con una cabeza de flecha. Las cisteínas se destacan con un círculo. Los cebadores específicos utilizados para obtener la secuencia completa se indican subrayados.

## 2.2 Comparación de la secuencia de Ole e 13 con la de otras TLPs homólogas

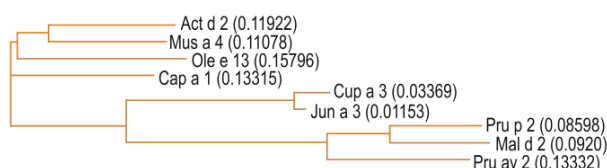
La secuencia de Ole e 13 madura se ha comparado con la de otras taumatinas de diversas fuentes alergénicas vegetales como frutas y hortalizas o pólenes, descritas todas ellas como alérgenos (FIG. 20A). El alineamiento de estas secuencias en comparación con Ole e 13 reveló una elevada identidad con la secuencia de la TLP de kiwi (Act d 2) (68%), la cual está glicosilada y tiene un punto isoeléctrico básico [Palacín y col., 2008], así como con las taumatinas de pimiento (Cap a 1) [Fuchs y col., 2002] (68%) y plátano (Mus a 4) [Barre y col., 2000; Palacín y col., 2012] (67%), ambas carentes de sitios de N-glicosilación y por tanto sin azúcares incorporados en residuos de Asn. Por el contrario, las TLP procedentes de la familia *Rosaceae*, Pru av 2 de cereza (37%), Pru p 2 de melocotón (36%) y Mal d 2 de manzana (34%) presentan porcentajes de identidad de secuencia con Ole e 13 significativamente más bajos, incluso menores que los de Cup a 3 y Jun a 3 de pólenes de enebro (53%) y ciprés (51%), respectivamente. Todas las secuencias incluidas en el alineamiento pertenecen a lo que se denominan taumatinas largas (21-26 kDa), caracterizándose éstas por presentar 16 residuos de cisteína, conservados en todas las proteínas, en lugar de 10

como es el caso de las TLPs cortas (16-17 kDa). El péptido señal de las TLPs comparadas en la figura 20 no se muestra en las secuencias alineadas, ya que solo se han incluido los aminoácidos correspondientes a las secuencias que codifican las proteínas maduras. Todas ellas comparadas conservan los cinco aminoácidos de la hendidura entre los dominios I y II (indicados con un asterisco en la figura 20), descritos como críticos para conferir el carácter ácido necesario para el desarrollo de actividad antifúngica por parte de estas proteínas [Liu y col., 2010].

A



B



**FIGURA 20. Comparación de secuencias de aminoácidos y filogenia de TLPs alérgicas. A,** Alineamiento de Ole e 13 con TLPs de *Actinidia deliciosa* (Act d 2, P81370), *Capsicum annuum* (Cap a 1, Q9ARG0), *Musa acuminata* (Mus a 4, PDB 1z3q), *Prunus avium* (Pru av 2, P50694), *Prunus persica* (Pru p 2.02.01, B6CQT5), *Malus domestica* (Mal d 2, Q9FSG7), *Cupressus arizonica* (Cup a 3, Q9FY35) y *Juniperus ashei* (Jun a 3, P81295). Los guiones indican huecos; el sombreado negro residuos conservados en todas las secuencias; el gris oscuro residuos conservados en al menos 7 y el gris claro los conservados en al menos 5. Porcentajes de identidad (% I) y similitud (% S) con Ole e 13. Los asteriscos indican los cinco aminoácidos conservados de la hendidura entre los dominios I y II. **B,** Análisis filogenético de las TLPs por el método de “neighbor-joining” (ClustalW), las distancias genéticas se indican entre paréntesis.

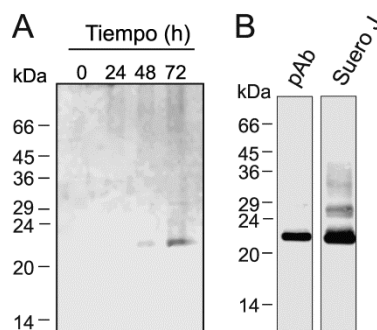
A pesar de que la familia de las TLPs es altamente divergente, podemos basarnos en la filogenia construida a partir de las nueve secuencias de taumatinas alergénicas mostradas en la figura 20, y distinguir claramente tres *clusters* que agruparían aquellas TLPs con mayor similitud entre sí. Ole e 13 pertenece al mismo *cluster* que Act d 2 y Mus a 4, y Cap a 1 sería un *cluster* en sí mismo, más próximo a Ole e 13 que a las demás TLPs (FIG. 20B).

### 2.3. Producción recombinante de Ole e 13 en la levadura *Pichia pastoris*

La levadura *P. pastoris* presenta muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de organismos eucariotas, tales como el procesamiento de las proteínas, la formación de puentes disulfuro y las modificaciones postraduccionales, y además se trata de un sistema de fácil manipulación como pueden ser los basados en *E. coli* o *S. cerevisiae*, pero a diferencia de este segundo evita problemas de hiperglicosilación en los sitios consenso. Al presentar este sistema de producción estas ventajas y proporcionar elevados niveles de expresión, fue el escogido para la producción recombinante del alérgeno Ole e 13.

Para la obtención de colonias transformantes de células KM71 con la construcción pPICZ $\alpha$ A/Ole e 13 se siguió el procedimiento indicado en Materiales y Métodos, seleccionándolas en medio YPDS en presencia del antibiótico zeocina. Estas colonias presentan un fenotipo Mut<sup>s</sup>, es decir, con un crecimiento lento en metanol causado por la interrupción del gen AOX1 a la hora de insertar el DNA seleccionado, y fueron testadas para la expresión de rOle e 13. Se tomaron muestras del cultivo a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 h) y se analizó el nivel de expresión en el medio extracelular después de sedimentar las células (FIG. 21A), consiguiéndose la máxima producción tras 72 h de inducción con metanol. Se seleccionó aquella colonia con la que se obtuvo un mayor rendimiento en la producción y una menor degradación. Para confirmar que la proteína expresada era Ole e 13, se transfirieron las muestras a

membranas de nitrocelulosa y se llevaron a cabo inmunotinciones con el anticuerpo policlonal específico de Ole e 13 y con el suero del paciente J (FIG. 21B).

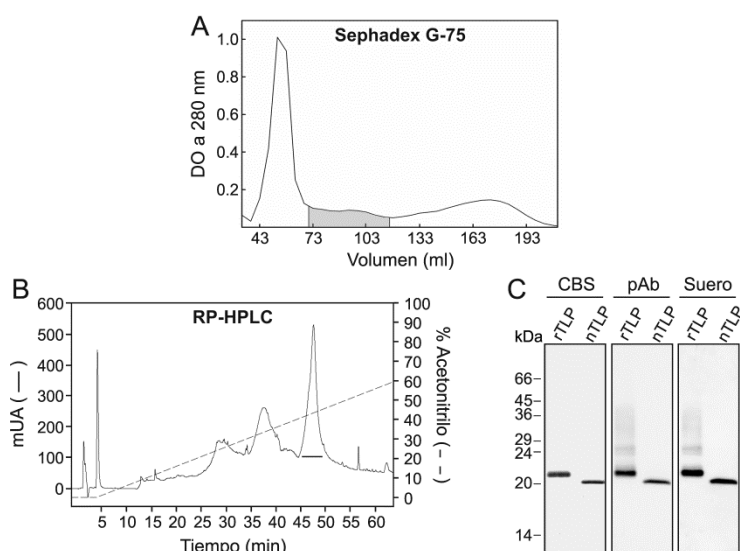


**FIGURA 21. Cinética de expresión e inmunotinción de rOle e 13.** **A**, La cinética de expresión se realizó cada 24 h hasta las 72 h de inducción en células KM71. **B**, Inmunotinción de rOle e 13 con el anticuerpo policlonal anti-nOle e 13 (pAb) y con el suero del paciente J (Suero J).

## 2.4. Purificación de rOle e 13

El aislamiento de rOle e 13 se llevó a cabo mediante dos etapas cromatográficas consecutivas. Tras la diálisis del medio extracelular frente a bicarbonato amónico 20 mM, éste se liofilizó y resuspendió para llevar a cabo una cromatografía de penetrabilidad mediante su aplicación en una columna de Sephadex G-75 (FIG. 22A) equilibrada en bicarbonato amónico 0.2 M. La proteína recombinante se detectó tras PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie de las fracciones eluidas de la cromatografía, y aquellas que contenían la proteína recombinante se juntaron y liofilizaron. Se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 2.5 mg de proteína purificada/litro de cultivo. La segunda etapa de purificación consistió en una cromatografía en RP-HPLC en una columna Nucleosil-C18, aplicando un gradiente de acetonitrilo del 0 al 60% (FIG. 22B). El resultado de la purificación se analizó por tinción con azul de Coomassie tras PAGE-SDS e inmunotinción de la proteína (FIG. 22C).

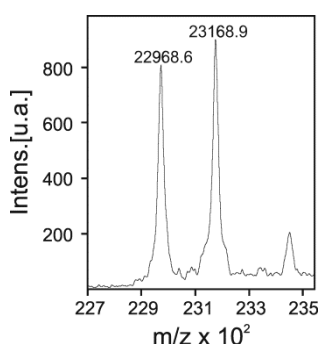
La proteína recombinante obtenida poseía una masa molecular ligeramente superior a la proteína purificada de la fuente natural, resultando en una menor movilidad electroforética. Teniendo en cuenta la intensidad de cada una de las bandas en la tinción con Coomassie, el reconocimiento de la proteína recombinante obtenida fue igual al de la proteína purificada de la aceituna (FIG. 22C), tanto por el anticuerpo policlonal específico como por el suero del paciente J con IgE dirigidas a Ole e 13, lo que sugiere un plegamiento muy similar entre ambas proteínas. Al no verse afectada la capacidad de reconocimiento tanto de las IgG específicas como de las IgE del suero del paciente J alérgico a la aceituna, se siguió adelante con la purificación de la proteína recombinante expresada.



**FIGURA 22. Etapas de purificación de rOle e 13 producida en *P. pastoris*.** **A**, Cromatografía en Sephadex G-75 donde la zona sombreada en gris indica las fracciones que contienen rOle e 13 y **B**, RP-HPLC en Nucleosil-C18 donde se indica el pico de elución con una raya. **C**, Análisis en PAGE-SDS de rOle e 13 en comparación con nOle e 13: CBS, tinción con azul de Coomassie; pAb, inmunotinción con el pAb anti-nOle e 13; Suero, inmunotinción con el suero J.

## 2.5. Caracterización molecular de rOle e 13

El análisis por **espectrometría de masas** de la proteína purificada dio lugar a dos picos mayoritarios de 22968.6 Da y 23168.9 Da (FIG. 23). Aunque es común que las proteínas secretadas por *P. pastoris* presenten glicosilaciones ricas en manosas del tipo Man<sub>8-11</sub>-NAcGluc<sub>2</sub> [Gemmill y col., 1999], la ausencia de sitios consenso de N-glicosilación en la secuencia de Ole e 13, descartó la posible presencia de N-glicanos en la proteína.



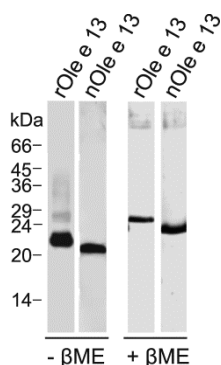
**FIGURA 23. Análisis por espectrometría de masas de rOle e 13.** u.a, unidades arbitrarias. m/z, relación masa/carga.

Por otro lado, se secuenció por degradación de Edman, el extremo N-terminal de Ole e 13. Las secuencias aminoácidas obtenidas correspondían con nueve y once aminoácidos extra, probablemente como consecuencia de un procesamiento incorrecto del extremo N-terminal de la proteína por parte de las endopeptidasas de *P. pastoris*, hecho que ha sido previamente documentado para otras proteínas [Faus, 2000]. El incremento de masa molecular de cada pico -teniendo en cuenta los segmentos extra- respecto de la masa molecular teórica se ajusta con una diferencia de 18 Da, siendo EEGVSLEKR la secuencia extra correspondiente al pico de 22968.6 Da y AKEEGVSLEKR la del segundo pico.

Se analizó posteriormente el efecto de las **condiciones reducidas** en la movilidad electroforética de rOle e 13 así como en su reconocimiento por IgE, comparándola con nOle e 13. Para ello se trataron ambas proteínas con  $\beta$ ME y se



calentaron durante 10 min a 90 °C, y tras PAGE-SDS se procedió a la inmunotinción con el suero J de las proteínas transferidas a membrana (FIG. 24). El tratamiento reductor produjo una disminución de la movilidad electroforética de ambas proteínas, lo que estaría indicando un cambio en la estructura terciaria de la proteína debido a la ruptura de los numerosos puentes disulfuro que posee la molécula, que al desplegarse mostraría un aumento de la masa molecular aparente. También se observa una disminución en la unión de IgEs tanto de la proteína recombinante como de la natural, de un 76% y un 30%, respectivamente, lo cual indica la presencia de epítomos conformacionales que desaparecerían con la desnaturalización de la proteína.

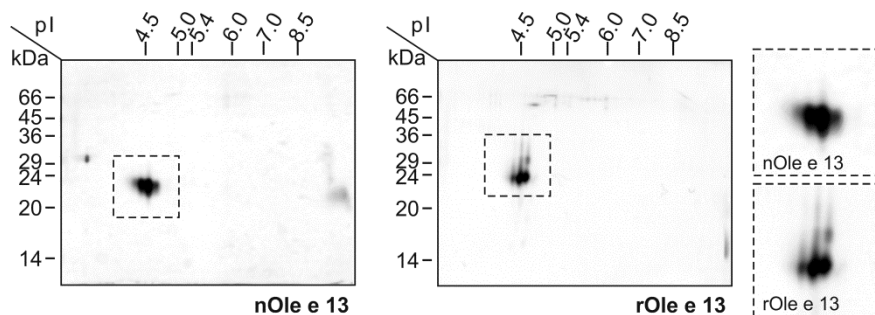


**FIGURA 24.** Inmunotinción con suero J de rOle e 13 y nOle e 13 en condiciones reducidas (+ βME) y sin reducir (- βME). Suero utilizado a una dilución 1:10.

Los puentes disulfuro tanto inter- como intramoleculares mantienen la estructura tridimensional de la proteína de manera que cuando tienen lugar perturbaciones de la estructura -ocasionadas por calor o agentes químicos- éstas son frecuentemente reversibles. Importantes alérgenos alimentarios -nsLTPs, albúminas 2S, inhibidores de alfa-amilasa/tripsina o PRs- tienen un elevado número de puentes disulfuro, lo que debe estar relacionado con su estabilidad estructural.

Para conocer mejor algunos de los parámetros moleculares de la proteína, ésta fue sometida a **electroforesis bidimensional** y se determinó experimentalmente su punto isoeléctrico en comparación con el de la proteína purificada a partir de la aceituna natural (FIG. 25). Para el desarrollo de la primera dimensión se utilizaron tiras

de gel de gradiente de pH lineal (pH 3-10) en las que se adsorbió la muestra en presencia del agente reductor TBP. En la segunda dimensión las muestras fueron sometidas a PAGE-SDS para la separación de las proteínas en función de su tamaño, previa incubación de las tiras en un tampón de equilibrado con DTT. Las proteínas se visualizaron por tinción argéntica.



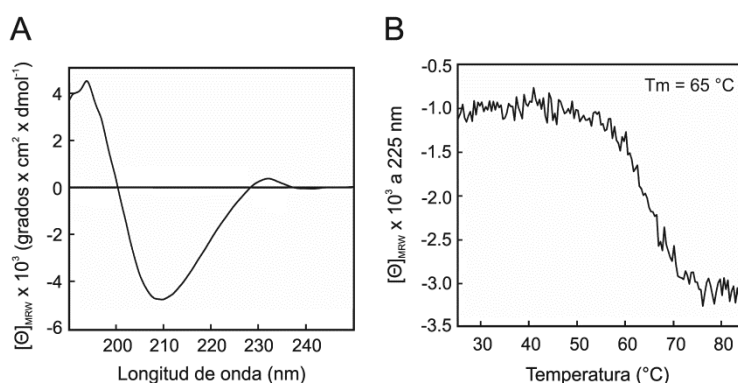
**FIGURA 25. Electroforesis bidimensional de n y rOle e 13.** Se indican tanto los marcadores de masa molecular (kDa) como los de punto isoeléctrico (pI), así como una ampliación de las manchas principales en cada caso.

En los experimentos de electroforesis bidimensional se observaron dos manchas principales tanto en Ole e 13 natural como en la recombinante, presentando en ambos casos valores de pI de alrededor de 4.5, siendo ligeramente más ácidos los de la proteína recombinante, probablemente debido a los residuos ionizables extra que posee rOle e 13, entre los que hay tres residuos ácidos (glutámicos) y dos o tres básicos (una arginina y una o dos lisinas). La movilidad electroforética es menor en rOle e 13 probablemente por la mayor masa molecular que posee esta molécula respecto a la purificada de la fuente natural (FIG. 25). Los manchas que se observan en la proteína natural deben corresponder a isoformas de la misma presentes en la aceituna, mientras que en el caso de la recombinante, la presencia de varias manchas ha de deberse al mal procesamiento de la proteína expresada en *P. pastoris*, tal y como muestra la espectrometría de masas, que desvela dos picos mayoritarios (FIG. 23). Al realizarse los experimentos en condiciones reductoras (en presencia de DTT) se

observa distinta movilidad electroforética tanto en nOle e 13 como en rOle e 13 respecto a las formas sin reducir, como ya se ha mostrado en la figura 22.

## 2.6. Caracterización espectroscópica

La proteína recombinante purificada se **analizó espectroscópicamente**. Se determinó su contenido en estructura secundaria tras la deconvolución de su espectro de DC en el UV lejano (FIG. 26A). La proteína consta de 8.4% de hélice  $\alpha$ , 28.2% de lámina  $\beta$ , 63.4% de ordenación aperiódica. Los porcentajes de estructura secundaria asignados concuerdan con los datos de estructura tridimensional publicados para estas proteínas [Leone y col., 2006; Ghosh y col., 2008].

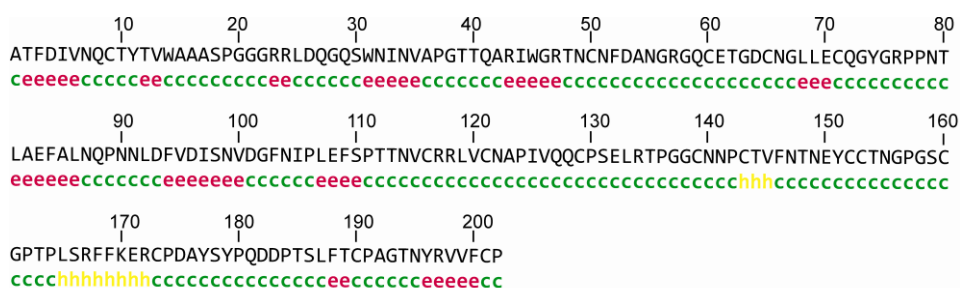


**FIGURA 26. Caracterización espectroscópica de rOle e 13.** A, Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano y B, curva de desnaturalización térmica de rOle e 13. Los espectros de dicroísmo se registraron a 20 °C y la desnaturalización térmica de la proteína a 225 nm de 25 °C a 85 °C. Los valores se expresan como elipticidad molar por residuo,  $\theta$ .

Para estudiar la estabilidad teórica de Ole e 13 se determinó su  $T_m$  registrando los cambios de elipticidad molar de la proteína a 225 nm al incrementar la temperatura de 25 °C a 80 °C a una velocidad de 30 °C/h. A partir de la curva de desnaturalización obtenida se calculó la  $T_m$  de Ole e 13, cuyo valor se estableció en 65 °C (FIG. 26B), lo que corresponde a una proteína termoestable, como es de esperar por su elevado número de puentes disulfuro.

## 2.7. Predicción de estructura secundaria

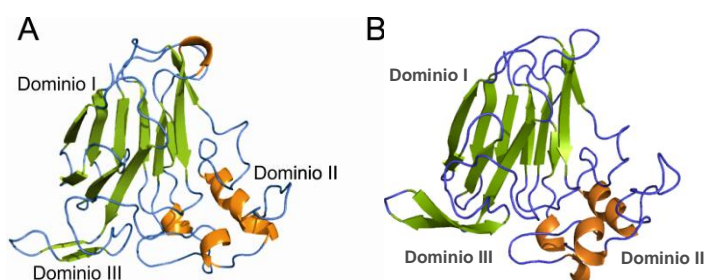
La predicción de estructura secundaria de la secuencia de la proteína madura se llevó a cabo según el método de *PROFphd* - Secondary Structure, Solvent Accessibility and Transmembrane Helices Prediction, utilizado por el programa *Predict Protein* (<https://www.predictprotein.org>), dando como resultado un 5.4% de hélice  $\alpha$ , 22.8% de lámina  $\beta$  y un 71.8% de ordenación aperiódica (FIG. 27). Los datos obtenidos muestran ligeras diferencias respecto a la composición de estructura secundaria obtenida experimentalmente por DC, probablemente debido a las particularidades de los sistemas de predicción o de cálculo utilizados en cada caso; si bien, en ambos casos predominan las regiones de ordenación aperiódica, siendo la lámina  $\beta$  el elemento de estructura secundaria ordenada repetitiva mayoritario.



**FIGURA 27. Predicción de estructura secundaria de Ole e 13.**  $\alpha$ -hélice (h) en amarillo, lámina  $\beta$  (e) en rosa, ordenación aperiódica (c) en verde.

La estructura tridimensional de las taumatinas ha sido determinada por difracción de rayos X [Leone y col., 2006; Ghosh y col., 2008] y en ella se aprecian tres dominios. El dominio I está formado por un  $\beta$ -sandwich con 11 hebras  $\beta$ , el dominio II formado por tres segmentos de hélice  $\alpha$  y dos hebras  $\beta$  flanqueándolos, y el dominio III compuesto por una serie de lazos de estructura aperiódica y una lámina  $\beta$  formada por dos hebras. En base a las estructuras tridimensionales disponibles de estas proteínas, se pueden predecir las de otras TLPs mediante modelado por homología - tomando como referencia una estructura conocida- (FIG. 28A).

El modelado tridimensional de Ole e 13 (FIG. 28B) fue realizado a través del servidor **SWISS-MODEL**, tomando como molde la proteína relacionada con patogénesis 5d (PR-5d) de *Nicotiana tabacum* [Koiwa y col., 1999], la cual tiene un 57% de identidad de secuencia con Ole e 13. El modelo 3D obtenido concuerda en general con la estructura globular descrita para otras TLPs de plantas. Las dos hebras  $\beta$  del dominio III que no aparecían en la predicción de estructura secundaria sí se modelan como tal, y se encuentran situadas en las posiciones 50-53 y 56-62 de la secuencia de Ole e 13 madura.



**FIGURA 28. Modelado 3D de Ole e 13 y comparación con el propuesto para la TLP de *N. tabacum*.**  
A, representación tridimensional de la estructura de PR-5d de *N. tabacum* y B, modelado de Ole e 13.

### 3. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE rOle e 13

Aunque hay un elevado grado de similitud conformacional y de secuencia entre la taumatina procedente de *Thaumatococcus daniellii* y las TLPs, no todas las TLPs tienen las mismas características bioquímicas ni la misma función biológica, ya sea su alergenicidad, actividad antifúngica, actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, unión a  $\beta$ -glucanos o actividad quinasa. Hasta la fecha no se tiene el conocimiento del porqué de esta diversidad funcional [Narasimhan y col., 2009; Liu y col., 2010]. Se ha descrito que algunos miembros de la familia de las TLPs de hongos presentan actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa [Grenier y col., 1999; Osmond y col., 2001; Menu-Bouaouiche y col., 2003],

especialmente hongos patógenos filamentosos, capaces de degradar la pared de otros hongos. La actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en las TLPs de plantas no siempre está relacionada con su actividad antifúngica [van Loon y col., 2006]. Esto es lo que ocurre en la TLP de plátano que, a pesar de poseer actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, carece de capacidad antifúngica. Ello sugiere que el mecanismo de defensa ante hongos de las TLPs no se limita sólo a esta actividad enzimática pueden confluír otro tipo de mecanismos como la permeabilización de la membrana celular en hongos [Abad y col., 1996], o actividades como la de inhibidor de xilanasa [Fierens y col., 2007]. Algunos autores relacionan la actividad antifúngica con cierta disposición estructural de los dominios I y II de su estructura terciaria, ya que entre ellos se forma una hendidura rica en residuos hidrofóbicos y ácidos, susceptibles de participar en la interacción con receptores específicos de la membrana celular del hongo [Min y col., 2004] (ver residuos señalados con un asterisco en la secuencia de la figura 20).

En aceitunas, se ha descrito diversos hongos causantes de su podredumbre entre los que se incluyen *Colletotrichum acutatum* y *C. gloeosporioides*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum luteum*, *Pseudocercospora cladosporioides* y *Camarosporium dalmaticum*. La mayoría de estas especies de hongos son saprófitas o invasoras oportunistas que penetran en el fruto a través de heridas, aunque hay miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* - *Colletotrichum*, *P. cladosporioides*, *Truncatella Angustata*- que son capaces de atacar directamente a la aceituna [Torbatí y col., 2013].

### 3.1. Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa

La actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de rOle e 13 fue ensayada mediante el método colorimétrico de Nelson-Somogyi -detallado en Materiales y Métodos-, el cual permite cuantificar los equivalentes de glucosa liberados como consecuencia de la actividad enzimática, midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción a 540 nm. Se utilizó como sustrato el polisacárido  $\beta$ -1,3-glucano, laminarina, y como control positivo del

ensayo la actividad de la enzima laminarinasa. Además se empleó una reacción sin enzima como control de la posible hidrólisis espontánea del sustrato. Las reacciones se llevaron a cabo a pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0, y se incubaron a 37 °C durante 16 h en baño de agua con agitación suave. Transcurrido dicho tiempo se desarrolló la reacción colorimétrica tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. El resultado del ensayo fue negativo en las condiciones ensayadas (resultado no mostrado). Por tanto, rOle e 13 carece de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa *in vitro* en las condiciones ensayadas.

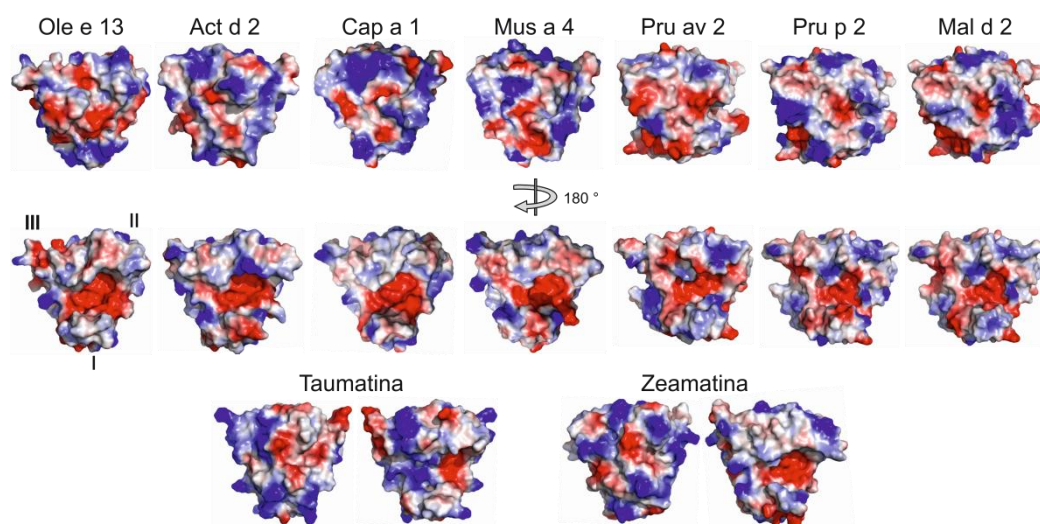
### 3.2. Actividad antifúngica

No se conoce el mecanismo exacto por el que las TLPs incrementan la permeabilidad de la membrana plasmática de las células para ejercer su actividad antifúngica. Se ha sugerido tanto un efecto directo sobre la pared celular de plantas [Yun y col., 1997] u hongos [Trudel y col., 1998], como una interacción de la superficie cargada negativamente de las PR-5 con las cargas positivas de ciertas proteínas de membrana, como mecanismos de acción de estas enzimas con efecto tóxico.

La actividad antifúngica de rOle e 13 purificada se testó frente a los hongos *F. oxysporum* y *A. niger* -utilizados en la bibliografía en ensayos de actividad antifúngica de otras taumatinas [Mani y col., 2012; Yasmin y col., 2013]- tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. No se observó inhibición del crecimiento de ninguno de los dos hongos empleados en presencia de rOle e 13 en las condiciones ensayadas (comunicación personal de la Dra. Belén Patiño).

Cuando se realiza la asignación del potencial electrostático sobre el modelado de la estructura tridimensional de Ole e 13, mediante el programa PyMOL, y se compara con el de otras taumatinas (FIG. 29), se observa el carácter ácido de los residuos -destacado en rojo- localizados en la hendidura entre los dominios I y II (FIG. 29, moléculas giradas 180°). Los datos que se extraen de estas imágenes son de

carácter cualitativo, ya que no representan una relación del potencial con la posición y la distribución de carga que lo genera, sino un promedio de las cargas de diferentes regiones de la molécula sin tener en cuenta las interacciones de los átomos con el solvente. Por ello, a pesar de que existen datos cuantitativos publicados referentes a algunas de las TLPs que aquí se manejan, se ha utilizado el mismo tratamiento informático de “modelado de cargas” a todas ellas.



**FIGURA 29. Distribución de cargas sobre la superficie de diversas estructuras de TLPs.** Los potenciales electrostáticos negativos se indican en rojo y los positivos en azul, las superficies no cargadas aparecen en blanco. En la fila central aparecen las moléculas con un giro de 180° respecto a la fila superior, mostrando la hendidura entre los dominios I y II indicados en la imagen.

En la fila inferior de la figura 29, se muestran dos ejemplos de proteínas de la familia PR-5, una carente de actividad antifúngica como es la taumatina procedente de los arilos del arbusto *T. daniellii* [Min y col., 2004], y la otra con actividad antifúngica como es la zeamatina de maíz (*Zea mays*) [Batalia y col., 1996]. En general, la distribución local de cargas de estas proteínas es más parecida a la de la zeamatina que a la de la taumatina, sin embargo, no todas presentan actividad antifúngica. Ésta se ha descrito en Act d 2 [Gavrovic-Jankulovic y col., 2002], Mal d 2 [Krebitz y col., 2003], Mus a 4 [Leone y col., 2006] y Pru p 2 [Palacín y col., 2010], mientras que Pru av 2 [Grenier y col., 1999] carece de esta actividad biológica.



Las plantas responden al ataque de patógenos a través de la inducción de determinados mecanismos de defensa. Estos incluyen barreras mecánicas como carbohidratos y glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas en la pared celular que limitan la invasión de las hifas de los hongos, así como la síntesis de determinados metabolitos secundarios como fitoalexinas que son tóxicas para los hongos. La respuesta de plantas frente al ataque de patógenos también implica la inducción de proteínas de defensa (proteínas PR) actuando tanto a nivel local como sistémico, siendo principalmente relevantes la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa (PR-2), quitinasa (PR-4) y taumatina (PR-5). En el caso aquí estudiado de la actividad antifúngica de la taumatina de aceituna y al igual que ocurre en otras proteínas de la familia PR-5, hay otros factores además del carácter ácido de la hendidura que determinen el carácter antifúngico de estas proteínas, siendo las diferencias en la topología y el potencial electrostático de la superficie alrededor de la hendidura determinantes para la especificidad de estas PRs respecto a sus células diana.

#### 4. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE rOle e 13

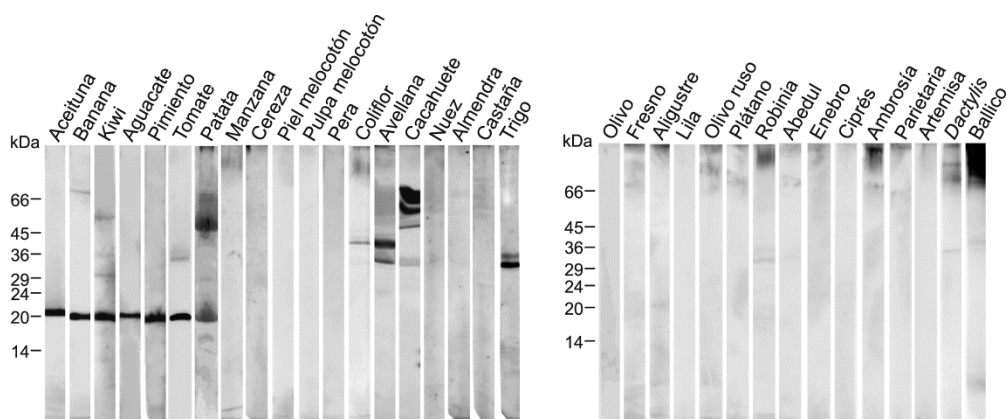
Ole e 13 como alérgeno de aceituna va a estar principalmente asociado a alergia ocupacional ocasionada por una sensibilización por inhalación, ya que al no preservarse esta proteína y sus epítopos B de forma íntegra en las aceitunas comestibles no va a poder ser responsable de la alergia alimentaria a la aceituna.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se han descrito varias TLPs como alérgenos en alimentos vegetales y algunas de ellas presentan una elevada identidad de secuencia con Ole e 13. Por este motivo, se planteó la necesidad de estudiar en mayor profundidad la posible reactividad cruzada a nivel de epítopos IgE de estos alérgenos con la TLP de aceituna, utilizando una población suficientemente amplia de sueros de pacientes alérgicos a estas taumatinas o susceptibles de serlo por presentar

test cutáneo positivo a los alimentos de origen de dichas TLPs. Estudios recientes [Palacín y col., 2012] indican que un bajo porcentaje (6.9%) de los pacientes testados alérgicos a frutas -de la familia *Rosaceae*- presentarían IgE con capacidad de unión a Ole e 13.

#### 4.1. Presencia de proteínas homólogas a Ole e 13 en diversos alimentos de origen vegetal

Mediante inmunotransferencia utilizando el pAb específico anti-Ole e 13 se testaron distintos extractos de alimentos vegetales tales como frutas y verduras de uso frecuente en la alimentación mediterránea, frutos secos y pólenes (FIG. 30). Con ellos se pudo determinar la existencia de proteínas homólogas a Ole e 13. De todos los extractos testados, fueron los de plátano, kiwi, pimienta, aguacate, tomate, patata y aceituna los que mostraron una banda reactiva al anticuerpo anti-Ole e 13; la banda presente en aceituna y aguacate tenía 22 kDa, y 20 kDa las restantes (FIG. 30). Por el contrario, en, coliflor, avellana, cacahuete y trigo se detectaron bandas de mayor masa molecular. En los extractos con bandas reactivas al anticuerpo específico entre 20-22 kDa, han sido descritas TLPs alérgicas salvo en aguacate, donde ha sido identificada esta proteína en un estudio del proteoma de la pulpa de este fruto [Esteve y col., 2011] pero no ha llegado a ser clasificada como alérgeno, y en patata.

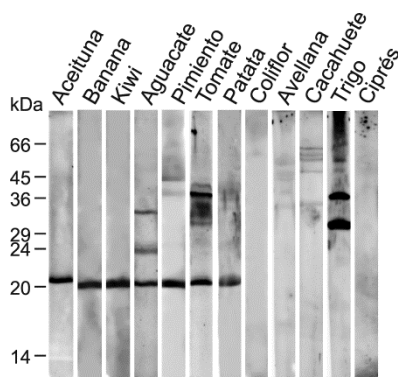


**FIGURA 30.** Análisis mediante inmunotransferencia del reconocimiento de TLPs en extractos de alimentos vegetales y pólenes por el pAb anti-Ole e 13. Se utilizaron 40 µg de todos los extractos ensayados.

Hasta la fecha sólo se han descrito TLPs alergénicas en pólenes de la familia de las Cupresáceas - Jun a 3, Jun r 3 y Jun v 3 en enebro, Cup a 3 y Cup s 3 en ciprés, Cry j 3 en sugi- [Midoro-Horiuti y col., 2000; Cortegano y col., 2004; Fujimura y col., 2007]. Ninguno de los pólenes testados fue reconocido por el pAb anti-Ole e 13 (FIG. 30).

#### 4.2. Reactividad cruzada de Ole e 13 con otras TLPs a nivel de IgE

Los extractos que presentaban una banda reconocida por el pAb anti-Ole e 13 fueron testados mediante inmunotinción con el suero J para comprobar si las proteínas detectadas eran capaces de unir IgE del suero de este paciente. Se incluyeron también en el ensayo los extractos de coliflor, avellana, cacahuete y trigo por presentar bandas reactivas a IgG aunque de mayor masa molecular y así poder descartar o confirmar su reactividad frente a IgE (FIG. 31).

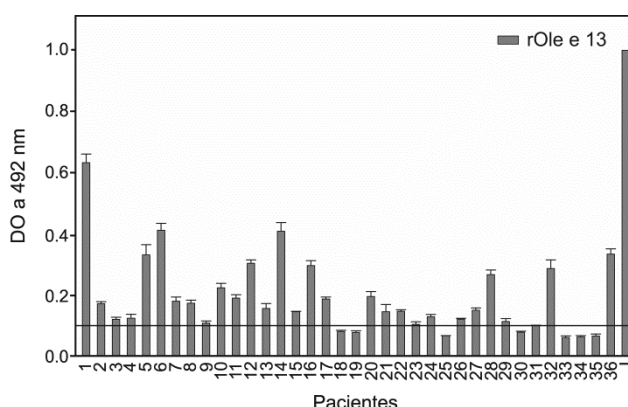


**FIGURA 31. Inmunotinción con el suero J de diferentes extractos transferidos a membrana.** Se utilizaron 40 µg de todos los extractos ensayados.

Los mismos extractos que mostraron una banda claramente reconocida por el pAb anti-Ole e 13 exhibieron igual reconocimiento por las IgE del suero del paciente. En trigo una proteína de alrededor de 32 kDa es reconocida tanto por IgG específicas de Ole e 13 (FIG. 30) como por IgE del suero del paciente alérgico a Ole e 13. Esta masa molecular en principio es demasiado elevada para una TLP y no coincide con ninguna TLP de las descritas en trigo, que son todas cortas [Rebmann y col., 1991; Yu y col., 2003], por lo que parece tratarse de otra proteína con algún epítipo homólogo a Ole e

13. En tomate se han descrito también TLPs alergénicas [Ghosh y col., 2008], algunas de ellas presentando una elevada identidad de secuencia (66%) con Ole e 13, al igual que en pimiento, plátano y kiwi, donde hay también TLPs descritas [Jensen-Jarolim y col., 1998; Barre y col., 2000; Gavrovic-Jankulovic y col., 2002]. En patata, sin embargo, se han identificado TLPs, pero ninguna ha sido descrita como alérgeno. El hecho de que sea reconocida una banda de unos 20 kDa por IgG específicas de la TLP de aceituna así como por anticuerpos IgE podría indicar la existencia de una TLP potencialmente alergénica en patata. Este tubérculo se utiliza principalmente cocinado, pudiendo verse afectada la capacidad alergénica de la TLP por las temperaturas elevadas, sin embargo, también es un producto utilizado crudo en remedios caseros para el cuidado de la piel por su elevado contenido en almidón - con propiedades emolientes-, y que se manipula también crudo antes de su cocinado, pudiendo dar lugar a dermatitis o urticaria por contacto como ya se ha descrito en la literatura [Quirce y col., 1989; Gómez Torrijos y col., 2001; de Lagran y col., 2009], procesos alergénicos en los que la TLP podría desempeñar un papel sensibilizante.

Para tratar de obtener información más completa acerca de la reactividad cruzada entre Ole e 13 y otras TLPs se ampliaron las poblaciones de pacientes alergénicos a estudiar. Se emplearon sueros de pacientes del Hospital La Paz de Madrid que acudieron a consulta por alergia a alimentos de origen vegetal, presentando pruebas cutáneas positivas a algunos de dichos alimentos. Se escogieron principalmente aquellos sueros con reactividad a alimentos en los que se había detectado previamente reconocimiento de TLPs por el pAb anti-Ole e 13. De los 36 sueros testados 28 fueron positivos a rOle e 13, es decir, un 77.8%, de los cuales 11 presentan valores de DO superiores a 0.2 (FIG. 32). Para los pacientes cuyos sueros fueron capaces de reconocer a la taumatina de aceituna destacan como alimentos alergénicos el tomate, plátano, aguacate, kiwi, melocotón, avellana, nuez, castaña, el pistacho y el cacahuete.



**FIGURA 32. ELISA de unión de IgE de 36 sueros de pacientes alérgicos a alimentos vegetales.**  
0.1 µg de rOle e 13 tapizados por pocillo. Dilución 1:10 de los sueros.

Si contrastamos el resultado del análisis inmunológico con el perfil alérgico de los pacientes (TABLA 9), el tomate (35.7%), el plátano (53.6%), el aguacate (35.7%) y el kiwi (32.1%) aparecen asociados con alta prevalencia a los pacientes con IgE dirigidas a rOle e 13, aunque algunos individuos con elevados niveles de IgE capaces de reconocer a rOle e 13 no tienen IgE específica frente a alimentos en los que se han descrito TLPs (pacientes 10 y 36 de la tabla 9).

La variación en los niveles de expresión biológica los alérgenos en sus fuentes de origen y la presencia de isoformas dificultan en general la extrapolación de los resultados obtenidos en un grupo concreto a una mayor población alérgica. En nuestro caso, al tratarse además de una población heterogénea, no seleccionada por una alergia concreta a aceituna, sino por presentar IgE reactivas a otros alimentos vegetales con TLPs alérgicas, no podemos obtener resultados concluyentes de este estudio. A pesar de ello, parece haber uno o varios epítopos conservados entre Ole e 13 y otras TLPs alérgicas, a través de los cuales los pacientes podrían presentar manifestaciones alérgicas por reactividad cruzada.

**TABLA 9. Perfil alergénico de 36 pacientes alérgicos a alimentos vegetales.** Se indican los valores de RAST (1-6) de cada paciente para los diversos alimentos. En verde se destacan los alimentos con TLP de elevada similitud de secuencia con Ole e 13 y en azul los restantes con TLP alérgica. Los números en naranja son los sueros positivos a Ole e 13, siendo los de DO > 0.2 los de color más intenso.

	Tomate	Perejil	Plátano	Aguaate	Pistacho	Trigo	Almorta	Cacahuete	Avellana	Almendra	Zanahoria	Naranja	Papa girasol	Cebolla	Kiwi	Melón	Mostaza	Pera	Melocotón	Piña	Lechuga	Ciruela	Nuez	Castaña	Garbanzo	Apio	Manzana	Patata
1	3														2	2			2						2	2	3	
2	3															2												
3	3		1		3					2	3	3				2										2		
4	3							2	2																			
5	3							3	3	2								2	3	2		3		3		4		
6			3										3											3				
7																												
8		3			2			3	2								2							2				
9		3						3																				
10		3									4														4		2	
11								4	3								2											
12	4							5	4	3					2		3							4				
13							3								2						3							
14			3	3																				2				
15			3	3															2									
16	4	4												5											4		2	
17					4																			3				
18			3																									
19			3																									
20			3																									
21			3																									
22			2	3	2										2					2				2	3			
23			2	3																								
24			2	3											2					3				2				
25			2	3																				2				
26	4		4	4								4			3	3		3	4									
27	4		3	3	3			3							3	3			4					3		5		
28	3		3	3											3					3				3				
29				3																								
30									2																			
31							3		2																3			
32					3										4													
33							2																		2			
34									3																2			
35									6																			
36					3																							

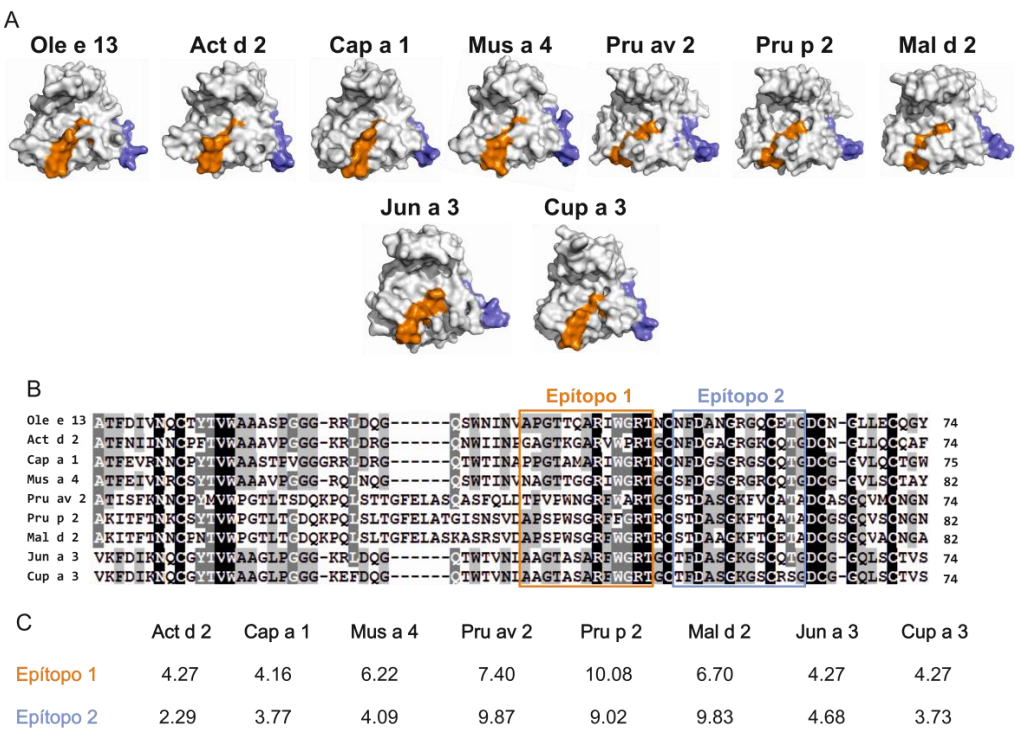
### 4.3. Predicción teórica de epítomos IgE de Ole e 13

Para la predicción de epítomos IgE de Ole e 13 se ha utilizado el servidor Algpred, basado en la similitud con otros epítomos IgE descritos en otras proteínas alergénicas. Dos fueron los epítomos identificados: (1) <sup>37</sup>APGTTQARIWGRT<sup>49</sup> y (2) <sup>52</sup>NFDANGRGQCETG<sup>64</sup>, ambos deducidos a partir de dos péptidos potencialmente alergénicos de Jun a 3, aunque ninguno experimentalmente determinado como tal. La determinación de epítomos IgE de Jun a 3, utilizando una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al cedro (*Juniperus ashei*), reveló que las zonas de unión de IgE se localizan en la región estructurada en hélice  $\alpha$  del dominio II de la proteína [Soman y col., 2000]. Se han determinado 3 epítomos IgE en la osmotina de *Nicotiana tabacum* - TLP con capacidad osmorreguladora- utilizando herramientas bioinformáticas y modificando la secuencia de las regiones identificadas para comprobar cómo afecta a su antigenicidad [Sharma y col., 2013]. De los 3 epítomos IgE descritos en osmotina, dos corresponden con los predichos en Ole e 13. Ambos epítomos -principalmente el epítomo 2- exhiben índices de similitud de secuencia (PD, del inglés “property distance index”) con Ole e 13 relativamente bajos, es decir, susceptibles de presentar antigenicidad (FIG. 33). Este índice, PD, permite identificar segmentos de una proteína con potencial reactividad cruzada en base a la similitud de las propiedades fisicoquímicas de su secuencia aminoacídica en comparación con la de otros epítomos IgE conocidos, indicando como más probables aquellos con valor óptimo de hasta 6 y un máximo de alrededor de 10 [Ivanciuc y col., 2009; Maleki y col., 2011].

	Ole e 13	Osmotina	
Epítomo 1	APGTTQARIWGRT	PRGTKMARVWGRT	6.58
Epítomo 2	NFDANGRGQCETG	NFNAAGRGCQTC	3.48
			PD

**FIGURA 33.** Índice de similitud de secuencia (PD) de dos epítomos teóricos de Ole e 13, en comparación con los epítomos identificados en la osmotina de *N. tabacum*. Los PD se calcularon utilizando las herramientas informáticas a tal efecto, proporcionadas por la plataforma SDAP.

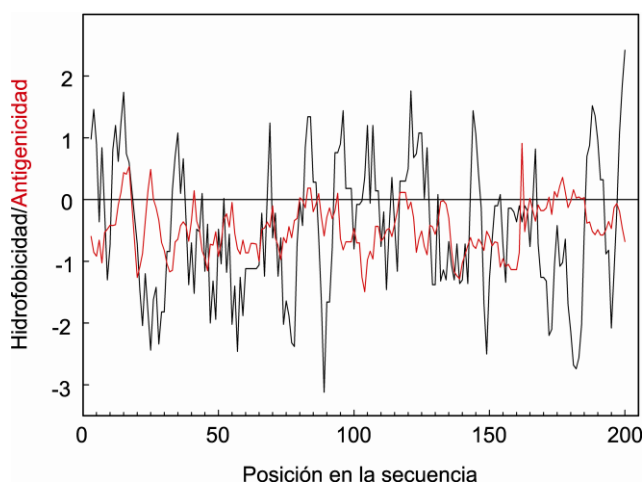
Si analizamos los PD obtenidos al comparar los dos epítomos determinados *in silico* para Ole e 13 con los equivalentes en otras TLPs, vemos que las TLPs pertenecientes a los miembros de la familia *Rosaceae* (cereza, melocotón y manzana) son las menos susceptibles de presentar reactividad cruzada con Ole e 13, al menos a través de estos dos epítomos (FIG. 34). Las TLPs de los pólenes de ciprés (Cup a 3) y enebro (Jun a 3) sí podrían presentar reactividad cruzada con Ole e 13. Sin embargo, esta reactividad no ha sido detectada con el suero del paciente utilizado en los ensayos (FIG. 31), probablemente debido a que no tiene IgE dirigidas hacia estos dos epítomos, pudiendo también influir el contenido en TLP del los pólenes utilizados, que puede variar drásticamente entre distintos lotes del mismo como ocurre con otros alérgenos [Duffort y col., 2006].



**FIGURA 34. Comparación de epítomos IgE, predichos para Ole e 13, entre diferentes TLPs. A,** Modelado 3D de Ole e 13, Act d 2, Cap a 1, Mus a 4, Pru av 2, Pru p 2, Mal d 2, Jun a 3 y Cup a 3. Se muestran en color naranja los residuos correspondientes al epítomo 1 y en azul los del epítomo 2. **B,** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las TLPs, destacando los dos epítomos comparados. **C,** Tabla con los PD de la secuencia de cada epítomo en comparación con los de Ole e 13.



A partir de la secuencia de aminoácidos de Ole e 13 se obtuvo su perfil de hidrofobicidad según el método descrito por Kyte y Doolittle [Kyte y col., 1982], así como el perfil de antigenicidad mediante el método de Welling [Welling y col., 1985]. Estos perfiles teóricos nos aportan más información a cerca de las zonas expuestas de la molécula y de su antigenicidad. Según los resultados, se podrían definir en Ole e 13 tres regiones antigénicas que coinciden con regiones expuestas al solvente. Estas regiones estarían las comprendidas entre los residuos 25-26, 174-178 y 181-185. Los epítomos teóricos 1 (residuos 36-48) y 2 (residuos 51-63) -determinados mediante el sistema Algpred- se situarían en una región hidrofílica -según el sistema de Kyte y Doolittle- lo cual lo haría accesible al reconocimiento por anticuerpos.



**FIGURA 35. Hidrofobicidad de Ole e 13.** Representación de las predicciones teóricas de hidrofobicidad y antigenicidad sobre la secuencia de Ole e 13. Negro, perfil de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle. Rojo, perfil de antigenicidad según Welling y col.

## PRIMERA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL

El olivo es una importante fuente de alérgenos, de los cuales 13 han sido identificados y caracterizados [Rodríguez y col., 2001; Villalba y col., 2013]. Muchos de ellos son proteínas con papeles fisiológicos y metabólicos cruciales en la planta, como en fertilidad (Ole e 1), señalización y reestructuración del citoesqueleto (profilina Ole e 2), modulación de la concentración de iones de calcio (polcalcina Ole e 3 y Ole e 8), remodelación de la pared celular (nsLTP Ole e 7), metabolismo de carbohidratos ( $\beta$ -1,3-glucanasa Ole e 9 y Ole e 4, proteína de unión a carbohidratos Ole e 10, y pectin metilesterasa Ole e 11), y otras con actividad catalítica como la superóxido dismutasa Ole e 5 y la isoflavona reductasa Ole e 12, y proteínas de defensa como la TLP Ole e 13, o algunas con función desconocida como Ole e 6. Doce de estos alérgenos (Ole e 1 a Ole e 12) han sido identificados en el polen del olivo, mientras que Ole e 13 es la única proteína que ha sido caracterizada como alérgeno en la aceituna sin procesar [Palomares y col., 2008]. Esta TLP no parece ser causante de sintomatología por ingestión [Torres y col., 2014], a pesar de estar presente en la aceituna cruda y de que la inhalación de partículas procedentes de su molturado sea capaz de inducir alergia ocupacional [Palomares y col., 2008]. Esto se debe a que el proceso de maceración al que se someten las aceitunas provoca la degradación de Ole e 13 y la destrucción de sus epítomos IgE. Los pacientes que sufren polinosis a olivo pueden presentar alergia a alimentos vegetales como melocotón, kiwi, melón, o frutos secos, entre otros, a través de reactividad cruzada [Florido y col., 2002]. Recientemente se ha sugerido un nuevo síndrome polen-alimento (olivo-aceituna), en base al caso presentado por un paciente, donde la manifestación alérgica a la aceituna se atribuye a una exposición previa al polen de olivo, atribuyendo este síndrome a un proceso de reactividad cruzada entre el polen de olivo y la aceituna [Ünsel y col., 2009].

El hecho de que las aceitunas comestibles tengan una escasa capacidad de inducir alergia se debe probablemente a dos razones principales: i) el bajo contenido proteico del fruto (0.48 g de 100 g de aceituna), y ii) el exhaustivo procesamiento para convertir las aceitunas en un producto apto para el consumo, que implica tratamientos químicos drásticos capaces de desnaturalizar y degradar proteínas. Numerosos compuestos beneficiosos para la salud, especialmente compuestos fenólicos con propiedades atioxidantes como el hidroxitirosol, así como vitamina E y carotenos entre otros, han sido identificados en las aceitunas [Pérez-Jiménez y col., 2007], lo que ha llevado a un estudio más exhaustivo de los cambios en la composición de las distintas variedades como consecuencia de su procesamiento. Debido en parte a sus beneficios para la salud, el consumo de aceite de oliva está aumentando y, de la mano de éste, se ha visto incrementado también el de la aceituna, extendiéndose a zonas como Norteamérica, Australia o Asia. El aceite de oliva se utiliza tanto como ingrediente en una amplia variedad de productos cosméticos -como jabones, cremas o champús-, como puro por sus propiedades purificantes, hidratantes y nutritivas de piel, cabello y uñas, en lugar del aceite mineral. Es importante destacar por tanto, el papel potencial que podrían tener los productos derivados de la aceituna en el desarrollo de enfermedades tales como la alergia, a pesar de los pocos casos descritos hasta ahora [Malmkvist Padoan y col., 1990; Wong y col., 2004].

Como se ha mencionado anteriormente, el alérgeno Ole e 13 se encuentra en las aceitunas sin procesar y ha sido catalogado como una TLP. Las TLPs de plantas pertenecen a la familia 5 de proteínas relacionadas con patogénesis (PR-5) y constituyen la séptima familia de proteínas alergénicas más prevalente en alimentos vegetales, teniendo una relevancia considerable también dentro de los alérgenos de pólenes (puesto 11 de 29) [Radauer y col., 2006]. Ole e 13 ha sido caracterizado estructuralmente e inmunológicamente, y se ha comparado con otros miembros de la familia de las TLP de plantas descritos como alérgenos. La secuencia aminoacídica de Ole e 13 presenta elevada similitud de secuencia con las TLPs de kiwi, plátano, pimienta y aguacate, y sin embargo difiere en mayor medida de otras TLPs como las

de manzana, cereza o melocotón, procedentes esta últimas de la familia *Rosaceae*. El modelado de Ole e 13 se realizó por homología en base a la estructura cristalográfica determinada para la proteína PR-5d de *Nicotiana tabacum*, mostrando los tres dominios descritos en la estructura de esta familia de proteínas.

Para su estudio, se ha expresado Ole e 13 de manera recombinante en la levadura *P. pastoris*. La proteína obtenida presentó una serie de aminoácidos extra (12-14) en su extremo N-terminal, como consecuencia de un mal procesamiento, que no parecieron interferir en las propiedades inherentes de la misma. El análisis espectroscópico de rOle e 13 muestra valores de estructura secundaria acordes con la estructura determinada para otros miembros de esta familia de proteínas en plantas [Leone y col., 2006; Ghosh y col., 2008].

En cuanto al papel de las TLPs en patogénesis, la actividad antifúngica es destacable en algunas de ellas. Uno de los mecanismos propuestos para llevar a cabo esta actividad biológica está relacionado con la capacidad de romper la pared celular mediante actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa. Sin embargo, este mecanismo no siempre está ligado al carácter antifúngico de estas proteínas, siendo ambas actividades independientes como en el caso del alérgeno Mus a 4, que tiene actividad antifúngica pero carece de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa [Menu-Bouaouiche y col., 2003]. La actividad endo- $\beta$ -1,3-glucanasa de las TLPs requiere, además de un entorno electronegativo en la hendidura entre los dominios I y II, una posición favorable de los (1,3)- $\beta$ -D-glucanos respecto a los residuos ácidos del sitio catalítico para que se produzca la hidrólisis [Menu-Bouaouiche y col., 2003].

Diversos miembros de la familia de las TLP han sido relacionados con procesos de alergia a frutas, vegetales y pólenes. Mal d 2 de manzana [Oh y col., 2000], Mus a 4 de plátano [Barre y col., 2000], Act d 2 de kiwi [Gavrovic-Jankulovic y col., 2002], Cap a 1 de pimiento [Fuchs y col., 2002], Pru av 2 de cereza [Fuchs y col., 2006] y Pru p 2 de melocotón [Palacín y col., 2010], son las TLPs alergénicas de vegetales más relevantes. También contienen TLPs capaces de provocar alergia, otras fuentes vegetales como la

uva, lechuga, castaña, avellana o trigo, entre otros. Las TLPs son alérgenos importantes en los pólenes de *Juniperus ashei* (Jun a 3), de *Cupressus arizonica* (Cup a 3), y de *Cryptomeria japonica* (Cry j 3) [Midoro-Horiuti y col., 2000; Cortegano y col., 2004; Fujimura y col., 2007], cuya expresión parece verse incrementada con la contaminación ambiental [Cortegano y col., 2004]. Se han utilizado un anticuerpo específico de nOle e 13, y un suero de un paciente alérgico a aceituna [Palomares y col., 2008], para detectar similitudes antigénicas con TLPs presentes en extractos proteicos de origen vegetal con potencial alergénico. La reactividad observada con estos antisueros en los extractos de kiwi, pimienta y plátano, concuerda con los elevados valores de identidad/similitud de la secuencia aminoacídica de sus respectivas TLPs con la de Ole e 13. No se detectó reactividad en melocotón, cereza, manzana, así como en otros alimentos, ni en pólenes, incluidos los de ciprés y enebro. Estudios anteriores realizados en torno al papel de las TLP en la alergia alimentaria [Palacín y col., 2012] señalan la ausencia de co-sensibilización significativa de Ole e 13 con TLPs de otros vegetales y pólenes, en una población de pacientes alérgicos a frutas de la familia *Rosaceae*. Nuestros datos indican que Ole e 13 es susceptible de presentar reactividad cruzada con TLPs de plátano, kiwi, pimienta o aguacate, pero no con TLPs de rosáceas, tales como el melocotón, la cereza o la manzana, ni con pólenes. Esta reactividad cruzada a través de Ole e 13, podría afectar a aquellos pacientes sensibilizados a aceituna por inhalación que entrasen en contacto con alguna de las fuentes sensibilizantes anteriormente mencionadas como reactivas conteniendo este alérgeno.

El conocimiento de las características estructurales e inmunológicas de la TLP de aceituna es relevante para facilitar el diagnóstico de pacientes que pudieran estar sensibilizados a la aceituna sin macerar como agente sensibilizador primario, o bien a través de reactividad con TLPs de otras fuentes alergénicas. Ole e 13 no parece ser el único alérgeno de la aceituna, ya que se han detectado recientemente otras proteínas reactivas frente a anticuerpos IgE de una paciente, con de 14.4, 20.1, 30 y 45 kDa de masa molecular en la fracción liposoluble de este fruto [Álvarez-Eire y col., 2012].

Ninguna de ellas ha sido identificada y su alergenidad podría persistir tras el macerado de la aceituna. Sería por tanto interesante estudiar en detalle el perfil alérgico de la fracción liposoluble de las aceitunas y su posible impacto en la alergia.

## **2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**Results and discussion**

## SEGUNDO APARTADO. $\beta$ -1,3-glucanasas, una familia heterogénea de proteínas con capacidad alergénica. Estudio de su estructura, función y alergenicidad

---

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas (glucan endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidasas) constituyen una familia de proteínas ampliamente distribuidas en plantas, hongos y bacterias. Su actividad bioquímica se basa en la ruptura hidrolítica de los enlaces 1,3-D-glucosídicos en los  $\beta$ -1,3-glucanos, que son el principal componente de la pared celular de hongos y plantas. En plantas, participan en procesos como la división celular [Verma y col., 2005], la microsporogénesis [Worrall y col., 1992], el crecimiento del tubo polínico o la germinación de las semillas [Vogeli-Lange y col., 1994]. A las  $\beta$ -1,3-glucanasas de hongos se les atribuye un papel importante en morfogénesis, en la movilización de  $\beta$ -1,3-glucanos en respuesta al metabolismo de carbono, en el crecimiento de la pared celular, en autólisis y en mecanismos de reserva.

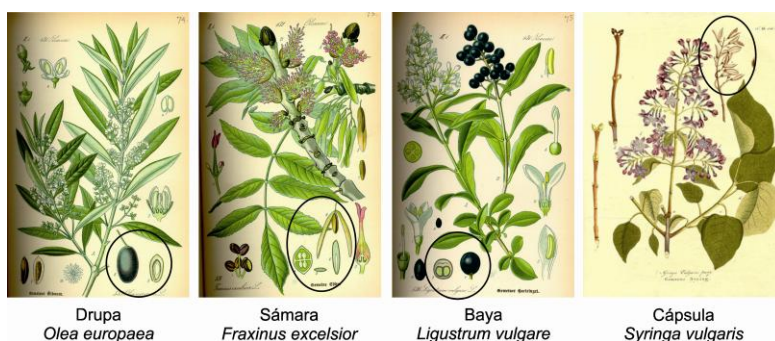
Las plantas encuentran un amplio espectro de polímeros de  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,3;1,6-glucanos en la pared celular de los hongos que las invaden. Algunas glucanasas de plantas están implicadas en procesos de defensa [Sánchez-Rangel y col., 2012], ejerciendo su actividad enzimática sobre la pared celular de estos hongos y liberando glucanos. Estos oligosacáridos liberados pueden actuar estimulando la expresión de genes de defensa de la planta.

Además de la importante actividad enzimática que desempeñan las  $\beta$ -1,3-glucanasas en plantas, a algunos de los miembros de esta familia se les ha atribuido también un papel destacable en procesos alérgicos, como es el caso de Ole e 9 en polen de olivo [Huecas y col., 2001], Mus a 5 en plátano [Barre y col., 2009] o Hev b 2 en látex [Alenius y col., 1995], y han sido implicadas en la reactividad cruzada entre látex-polen-vegetales [Wagner y col., 2004; Palomares y col., 2005]. A pesar de la relevancia alergénica de estas moléculas como agentes sensibilizadores en sus fuentes



de origen y a través de reactividad cruzada, estas enzimas no han sido estudiadas en profundidad.

La familia *Oleaceae* comprende 24 géneros de plantas leñosas, incluidos arbustos, árboles y plantas trepadoras. Como principales miembros de esta familia destacan los géneros *Olea*, *Fraxinus*, *Ligustrum*, *Phillyrea*, *Syringa* y *Jasminum*, muy diversos entre sí, ya que poseen distinto tipo de fruto: drupa en olivo y labiérnago sámara en el fresno, baya en aligustre y cápsula en lila (FIG. 35), así como diferente distribución geográfica. El fresno es característico de Europa Central, el olivo y el labiérnago del área mediterránea y el aligustre y la lila se extienden por toda Europa debido a su uso ornamental cada vez más extendido en parques y jardines. Si bien, el olivo es el miembro más relevante dentro de esta familia en cuanto a alergenicidad, y por tanto del que más se conoce, el fresno es una causa importante de polinosis en Europa Central, y su alergograma está poco estudiado, a pesar de mostrar un considerable número de proteínas reactivas a IgE casi tan elevado como el del polen de olivo [Hemmer y col., 2000; Niederberger y col., 2002; Barderas y col., 2005; Mas y col., 2014].



**FIGURA 35. Fisiología de los principales miembros de la familia *Oleaceae*.** Se indica el tipo de fruto característico de cada género, el cual se señala en la imagen respectiva con un círculo.

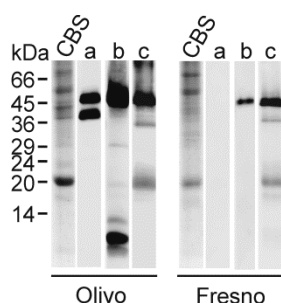
En base a estas premisas, y a los resultados previos que indicaban la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas con homología a Ole e 9 en polen de fresno [Palomares y col., 2005], se decidió estudiar en profundidad las  $\beta$ -1,3-glucanasas en polen de fresno, así

como explorar una amplia variedad de fuentes alérgicas vegetales en busca de glucanasas homólogas a Ole e 9 susceptibles de participar en procesos alérgicos.

## 1. IDENTIFICACIÓN, PRODUCCIÓN RECOMBINANTE Y CARACTERIZACIÓN DE LA $\beta$ -1,3-GLUCANASA DEL POLEN DE FRESNO

### 1.1. Detección de una $\beta$ -1,3-glucanasa en polen de fresno

La detección de  $\beta$ -1,3-glucanasas en polen de fresno se realizó mediante inmunotinción del extracto de dicho polen con los pAbs específicos obtenidos frente al rNtD y rCtD de Ole e 9 (FIG. 36). Con el pAb anti-rNtD-Ole e 9 no hubo reconocimiento en el extracto de polen de fresno en las condiciones empleadas (FIG. 36, carriles a), mientras que el pAb anti-rCtD-Ole e 9 mostró reconocimiento tanto en polen de fresno como de olivo (FIG. 36, carriles b), con la salvedad de que en el extracto de fresno se reconoce una única banda de  $\approx 46$  kDa, mientras que en el de olivo se detecta también una banda de  $\approx 10$  kDa. Esta banda corresponde a Ole e 10, alérgeno homólogo al CtD de Ole e 9.



**FIGURA 36. Inmunodetección de  $\beta$ -1,3-glucanasas homólogas a Ole e 9 en polen de fresno.** CBS, tinción con azul de Coomassie; **a**, tinción con pAb anti-rNtD-Ole e 9; **b**, tinción con pAb anti-rCtD-Ole e 9; **c**, tinción con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos a Ole e 9. 40  $\mu$ g/carril de cada extracto.

Se seleccionaron sueros de pacientes que reconocían de manera casi exclusiva a Ole e 9 y esta mezcla se testó tanto en extracto de polen de fresno como de olivo, observándose en ambos casos bandas intensas alrededor de 46 kDa (FIG. 36, carriles

c), lo que podría indicar la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas alergénicas en polen de fresno con epítomos IgE comunes a Ole e 9.

## 1.2. Clonación y secuenciación de Fra e 9, una $\beta$ -1,3-glucanasa del polen de fresno

El cDNA total del polen de fresno se empleó como molde para la amplificación por PCR de la secuencia codificante de Fra e 9. El proceso de clonación constó de varias etapas de PCR, recogidas en detalle en el apartado de Materiales y Métodos.

Como resultado de la secuenciación completa del cDNA codificante se obtuvieron dos clones, **Fra e 9.01** de 1383 pb que codifica una secuencia de 461 aminoácidos (Número de acceso en el GenBank KC920916) y **Fra e 9.02**, de mayor longitud, con 468 aminoácidos (Número de acceso en el GenBank KC920917) (FIG. 37).

Fra e 9.01	MEFSKRHSLEFFVLLFVYITLVQHFAAVNSIGVNYGTGLGNNLPPPAQVAQFLKERTIIDRVKLFVDVNPDLRAFAGTGI	78
Fra e 9.02	.....T.....	78
Fra e 9.01	FVAVITVNGEIPNLVNMKNARRWVGDNIRPFYPQTKINYLGVNEVLHWGPQNVIDNLVGAMRALHNALIRSGIQGVN	156
Fra e 9.02	.....A.....	156
Fra e 9.01	VTTAHALSILESSDPFSLAKFRPGWDKGLAPILQFLRQTKSPFMVNPYPYFGYSPEKADFALFKENPGVIDKYTKKL	234
Fra e 9.02	.....	234
Fra e 9.01	YTNMFDQLIDSVYTSMMKLGVDVEIAVGETGWASAGETFEPRCTIPNAASYNGGLVKRYNQGTGTPLLPGRKFETI	312
Fra e 9.02	.....	312
Fra e 9.01	FALFNENLKPGSLAERSFGLFQPDFTVPYDVGIMRGTAGVPDQFVPTPSVPEK-----PTQGNKKWCVPRAEAT	383
Fra e 9.02	.....T.SSPVEKH.....	390
Fra e 9.01	DAQLQSNIDYVCSQGGMDCGPIQANGACFNPTVRAHASVYVMSWYQSKGRNDFGCDGSGTGAVISSDPSNGSCSFLS	461
Fra e 9.02	.....R.....A.....D.N.....I.....	468

**FIGURA 37. Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida de las dos isoformas secuenciadas de Fra e 9.** Los puntos indican que no hay cambio de aminoácido, los guiones indican huecos introducidos en el alineamiento y los aminoácidos distintos respecto a Fra e 9.01 se indican en la secuencia inferior. La cabeza de flecha indica el sitio de procesamiento teórico. Se recuadra el fragmento extra de la isoforma Fra e 9.02 respecto a Fra e 9.01.

La diferencia en número de aminoácidos entre los dos clones se encuentra en la región de conexión entre los dos dominios de la molécula tal y como se muestra en la figura 37. En ambos casos, el domino N-terminal contiene la secuencia de un

péptido señal, cuyo sitio de procesamiento teórico se encuentra tras el residuo aminoacídico 29, que corresponde a una serina. Tras el procesamiento de Fra e 9.01 se obtiene una proteína madura de 432 aminoácidos y 46948.3 Da con *pI* teórico de 8.52, o de 439 aminoácidos, 47760.2 Da y *pI* de 8.66 para el caso de Fra e 9.02.

La secuencia de la proteína madura correspondiente a la isoforma Fra e 9.01 mostró mayor porcentaje de identidad (43%) y similitud (61%) con Ole e 9 que la isoforma Fra e 9.02 (41% y 59%, respectivamente). Es por ello que se seleccionó Fra e 9.01 -a la que a partir de ahora se va a hacer referencia en el texto como Fra e 9- para realizar los posteriores estudios, facilitando así su caracterización con poblaciones de sueros de pacientes con IgEs frente a Ole e 9, así como los ensayos comparativos entre ambas moléculas a nivel estructural, funcional, etc.

La secuencia de nucleótidos junto con la de aminoácidos deducida se muestra en la figura 38. La secuencia aminoacídica posee dos sitios potenciales de N-glicosilación (NXS/T) en las posiciones Asn-156 en el dominio N-terminal, y Asn-454 en el dominio C-terminal de la proteína madura indicados con un rectángulo. La tétrada de aminoácidos del sitio catalítico descrita para estas proteínas está conservada (Glu-264, Glu-318, Lys-321 y Glu-327, recuadradas en la secuencia de aminoácidos), así como el característico patrón de seis cisteínas del dominio C-terminal (señaladas con un círculo lila en la secuencia).

1	ATGGAGTTTCAAACGACACTCTTTATTCTCTGTCTTTTGGTTGTATATACTATTCTTGTTCACACTTCGCCGCCGTGAATTCT	29
	M E F S K R H S L F S V L L F V Y T I L V Q H F A A V N S	
88	ATCGGAGTTAATTACGGCACCCTCGGAAACAACCTCCCGCTCCGGCTCAAGTTGCACAGTTCCTCAAGGAGAAAACCACTCGAC	58
	I G V N Y G T L G N N L P P P A Q V A Q F L K E K T T I D	
175	AGAGTCAAGCTCTTCGACGTGAACCCAGATATTCTCCGGGCATTTCGGGGCACAGGAATCTTTGTCGCCGTCACTGTTCCGAACGGA	87
	R V K L F D V N P D I L R A F A G T G I F V A V T V P N G	
261	GAAATCCCTAACCTCGTCAACATGAAAAATGCTCGCAGGTGGGTGGTGACAACATTAACCACTTCTACCCACAACTAAAAACAAC	116
	E I P N L V N M K N A R R W V G D N I K P F Y P Q T K I N	
348	TACATTCTTGTGCGAAATGAAGTACTCCATTGGGGACCTCAAATCTGATTGATAATCTAGTTGGCGCCATGAGAGCTCTTCACAAT	145
	Y I L V G N E V L H W G P Q N L I D N L V G A M R A L H N	
435	GCACTCATCCGCTCTGGAATTCAAGGTGTTAATGTTACACGGCTCATGCTTTGAGTATTCTTGAATCGTCCGACCCACCGAGTTTG	174
	A L I R S G I Q G V <b>N V T</b> T A H A L S I L E S S D P P S L	
522	GCCAAGTTTCGACCGGGTGGGACAAGGAGATCTAGCTCCCATCTGCAATTTTACGGCAAAACAAATCTCCGTTTCATGGTGAAT	203
	A K F R P G W D K G D L A P I L Q F L R Q T K S P F M V N	
609	CCGTATCCATATTTTCGATACAGCCAGAAAAGGCAGATTTTGCACTCTTCAACCAACCCAGGTGTAACCGATAAAATACACTAAA	232
	P Y P Y F G Y S P E K A D F A L F K P N P G V T D K Y T K	
696	AAATTATACACGAACATGTTTCGATCAGTTAATCGATTAGTCTACACTTCTATGAAGAAATGGGCTATGGCGATGTGGAGATTGCT	261
	K L Y T N M F D Q L I D S V Y T S M K K L G Y G D V E I A	
783	GTAGCGGAGACTGGTGGGCTTCTCGAGGGGAGACTTTTGAACCAAAATGTAATTTCCAAATCGAGCTTCTTACAATGGGGGTTTG	290
	V A <b>E</b> T G W A S A G E T F E P K C T I P N A A S Y N G G L	
870	GTGAAGAAGTATAATCAAGGAACGGGACGCCATTGTTGCCGGGAAGGAAGTTCGAAACCTATATTTTGCACATTTTAACGAGAAT	319
	V K K Y N Q G T G T P L L P G R K F E T Y I F A L F N <b>E</b> N	
957	TTGAAGCCCGTTCTTTGGCTGAAAGGAGTTTCGGTTTGTTCAGCCAGATTTTACACCTGTTTATGATGTTGGAATCATGCGAGGA	348
	L <b>K</b> P G S L A <b>E</b> R S F G L F Q P D F T P V Y D V G I M R G	
1044	ACCGCAGGTGTGCTGATCAGCCCGTCCCAACACCCAGTCCATCAGTTCCAAAGCCTCCAACACAGGGCAACAAAAATGGTGCGTG	377
	T A G V P D Q P V P T P S P S V P K P P T Q G N K K W <b>C</b> V	
1131	CCGAAGGCTGAGGCCACTGATGCACAACCTGCAATCTAATATCGACTATGTATGCAGCCAAGCGGTATGGATTGCGGGCCAATTCAA	406
	P K A E A T D A Q L Q S N I D Y V <b>C</b> S Q G G M D <b>C</b> G P I Q	
1218	GCCAACGGTGCTTGTGTTCAACCTTAACACAGTACGGGCTCAGCATCTTATGTCATGAATCTTGGTACCAAAGCAAGGGTCGAAAT	435
	A N G A <b>C</b> F N P N T V R A H A S Y V M N S W Y Q S K G R N	
1305	GATTCGATTGTGATTTTCTGGCACCGTGCCGTACCTCTTCTGACCCAAGTAATGGGTGCTGCTCATTCTCTCTTGA	461
	D F D <b>C</b> D F S G T G A V T S S D P S <b>N G S</b> <b>C</b> S F L S *	

**FIGURA 38. Secuencia de nucleótidos del cDNA codificante de Fra e 9 y su secuencia deducida de aminoácidos.** El sitio de procesamiento se indica con una cabeza de flecha. Los residuos del péptido señal se indican en cursiva. Los residuos catalíticos se recuadran en verde, las cisteínas del dominio C-terminal se destacan con un círculo y los sitios potenciales de N-glicosilación se muestran recuadrados.

### 1.3. Fra e 9 pertenece a una familia de proteínas homólogas

Una vez se dispuso de la secuencia aminoacídica de la proteína, se realizó una búsqueda de proteínas homólogas utilizando el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los resultados de esta

búsqueda revelaron la similitud del dominio N-terminal con proteínas pertenecientes a la superfamilia 17 de glicosil-hidrolasas. El dominio C-terminal presentó similitud con los dominios X8, que contienen seis cisteínas conservadas formando puentes disulfuro. Este tipo de dominio se encuentra en Ole e 9, así como en el extremo C-terminal de diversas familias de glicosil-hidrolasas. Los dominios X8 están implicados en unión a carbohidratos, y son característicos de proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidilinositol). La proteína Fra e 9 madura presentó 64% de identidad con la  $\beta$ -1,3-glucanasa 14 de patata (*Solanum tuberosum*), un 60% con la glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidasa isoforma 1 de uva (*Vitis vinifera*), y un 59% con la endo-1,3- $\beta$ -glucanasa de pera (*Pyrus pyrifolia*).

La secuencia aminoacídica de Fra e 9 fue alineada con la de otras  $\beta$ -1,3-glucanasas disponibles en la base de datos de GenBank (FIG. 39A), incluyendo las de olivo, látex, plátano y tomate, descritas como alérgenos, la de pera por su elevada identidad y similitud de secuencia con Fra e 9 -58% y 74%, respectivamente- según los resultados obtenidos previamente mediante BLAST, y las de *Arabidopsis* [Hird y col., 1993] y cebada [Varghese y col., 1994] como unas de las más representativas de la familia de  $\beta$ -1,3-glucanasas de plantas por haber sido las primeras en ser descritas junto con la de tabaco. La secuencia de Fra e 9 -péptido señal incluido- mostró el porcentaje de identidad más elevado con la  $\beta$ -1,3-glucanasa de pera (56%), mientras que con Ole e 9 la identidad fue significativamente menor (40%), al igual que con A6 (35%), una  $\beta$ -1,3-glucanasa larga de las anteras de *Arabidopsis*. Si comparamos independientemente los dominios de la proteína madura Fra e 9 con los de Ole e 9, considerando NtD desde la Ile-30 hasta la Thr-349, y CtD desde la Ala-350 la Ser-461, obtenemos un 39% y un 56% de identidad, respectivamente (FIG. 39B).

A

Fra e 9.01	-----MEFSKRHSFFVLLFVYITLVQHFAAVNSIGNYGTIGNNLPFAQAQFLREKTTIDRVKFEVNPDIIRFAGTGFVAV	82
Olivo	-----MAANVQTSLLFLVFLLLQNFYSANSQSLGNYGQLSNLPSLQATVNLIRSTTHQKVRFGAEPAVIRFANTGVEIVI	81
Pera	-----MATTKLLYLLLLVLQLAATAYSGNYGTIADNLPFAQANFIRFQTTIDAVKFEANPDIIKRFANTNLSLTI	75
<i>A. thaliana</i>	MSLLAFPLFTILVFSSSSCATRFQGHRYMQRKTMLDLASKGNYGRRGNLSPYQSFNFKS-IKAGHVKLEADPESLTSQTHLYVTI	93
Látex	-----MAISSSTSGTSSSLPSTRTVMLLIFFTASLGITDAQVGYGMCQGNLPPVSEVIALYHQ-SNKKRMIRVDPNRAVEADLRGNSLIL	89
Banana	-----MATKASLSIKGFALLVSVLVAVPTRVQSHGVCYGMIGNLPPSEVSVLYRS-NNARMRIQDPNQAACQALRNSIQVLL	80
Tomate	-----MATSQIAIIVLLGLLVATNIHITAEQICVGYGMMGNLPSHSEVILQLYRS-RNRRRLRYTPNHGAANLRGSDIEVIL	78
Cebada	-----MARKDVASMAFAAFIGAAFAAVPTSVQSGNYGCVIGNLPSRSDIVQLYRS-KGNGMIRIFADGQALSLRNSGLIL	80
Fra e 9.01	TVPNGEIPNVN-MKNARRVVDNICKPFYQTKNHYLVGNEVLHWGP--QNVIDNLVGAARALHNAIRSE-IQG-VNVTAAHALSILESSDF	171
Olivo	GFNGDIPTASNPVNASQVYKSNVMSFYASNNIAITVGNVLTSGD--QKLSQLLEAMQNVQNALNAAS-LGGKVSVSTVHAMAVLSGSYF	172
Pera	TIPNGDIQSIN-LRTARHIIIDHKKPFYEATKKYIAMGSEVLHWGD--DALKSSLVFAMTFHNAIGEE-IKD-VKVSFPHSLGMMLSSDF	164
<i>A. thaliana</i>	TVPNHQITASSNQTIADENVRTNLPYVYQTCRFLVVGNEILSYNS--GNVSVNLVFAAMRKIVNSRLHE--IHNKVGCPAMDLSLRSSDF	183
Látex	GVNSDLQSHTN-PSNANSVYQKNVGFWSVLFRIYIAGNBEISPVNGGTAWLAQFVLEAMRIHDAIRSAE-LQDQIKVSTADLTLVGNSEYF	181
Banana	DVRSRVSQVJASNPAGDRIIRNVYVAYVSVSFRIYIAGNELIPGSD---LAQYILEAMRIIYFVFLGWFAKTRFVSAYDVTGVNLSEYF	170
Tomate	GLPNVDVKHISSGMEHARWVQKNVRDEWHVKIKYIAGNEISFVTG-TSNLAPFQVLELVNIYKIGEAC-LGNDIKVSVSDMTLIGNSEYF	170
Cebada	DIGNDQLANIAASTSNLASVQNVNVRPYHVNKKYIAGNEVQGGAT-----QSILEAMRNLANASAAE-LGAIKVSISIRFDEVANSF	166
Fra e 9.01	PSLAKRPGWGDGLDILQIRQKSEFMVVPFYPYHGS---PEKADFALFKPNPGVTDKYTKKINTMFDQLISYNTSMKKLYGDFEIA	261
Olivo	PSSGVNRP-GLGDTMKALLOQSANDAFMISFNPYHAKNQFPTDFAFCLEQPNAGQVDSNGHKTMDQADQVDAVHSLNAMEFKDIEII	265
Pera	PSTGRSRP-EVLPILAQLLECRQKSEFMVVPFYPYHGS---PEKENYALSRPNSGRDKFTGKFTMFDGLMDVYTSARAKIFGVDLII	253
<i>A. thaliana</i>	PSNGTSREEITGPVMLLLKKEGNGNSYFFLVHPFYRWSRNMNTSDFALQGHSTYTDPTQGLVRLHILQMLSELEMTKLSYPMRLA	277
Látex	PSAGASDDVR-SYLDPIEGESSIRSELLANINPYETIAGNERDISPYALSTSPSVVWV-DGQRGKMLFDATLALYSLEASGGGSEV	273
Banana	PSAGASSAAQ-AYLSPIVQFASNGAPLLVNVVYPSSTIGNEGQISPYALSTASGVVQ-DGRFSQMLQDAIVDAVFAFLERVGANVAV	262
Tomate	PSGSGSRNDVR-WFTDPIVGEIRDRAELLVNINPYBSISGNEGQISPYALSTAPNVVQ-DGSRGRRLDAMDLSYIYAMMORTGGSGVGI	262
Cebada	PSAEVSKN---AYMTDVARLHASTGAEALLANVMPYHARDNEGSSISNYTQPGTTRDQNNGLTSTSLDAMVAVYALEKAFAPAKV	256
Fra e 9.01	IAETGWASAGETFEFKCTINFAASNGGIVKKYNQG--TGTELLGRKFETIYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	348
Olivo	IAETGWPHGDSNEVGPSSLONKARVGNLLNLKSK--VGTPLMPGKSDTYLSLYDEDKTGGASSKVEGELRFPFGSTTDVGLLKN----	352
Pera	AGETGWPSA--CELPVCSVQNEADNGNLLKIESG--KGTPLMNRKLETIYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	343
<i>A. thaliana</i>	ISPTGWNFIDIDETGANIINATYNNRLKKMSASPPIGTSPSRGLPPEFVSELENENCKSGSGGTQRHWILHFGSGSIDVDVETGQ----	366
Látex	VSSSGWPSAG-AFAATF--DNGRTYLSNLQIVKG---GTPKRENRAETIYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	359
Banana	VSSSGWPSAGGGAEST--SMQATNQLLRIVGG---GTERREKKEIYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	341
Tomate	VSSSGWPSAG-AFGATH--EMQATYLRNLQIAKE---GSRKEG-PEITYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	347
Cebada	VSSSGWPSAG-GFAASA--GNERTYLRNLQIVKG---GTPKKRE-ALETYHEALNENLKPGLSARSGHGFQFTVVDVGIMRG----	334
Fra e 9.01	TAGVVPDQVPVTFPSVPKPTQGNKKWCVPKAEATDAQLSNIDYVCSQGGMDCGPIQANGACFPNFTVRAHASVYMNWYSQSKGRNDFGCDFS	442
Olivo	-----TQNFTTPTPTTFFKAAGSCWCPKPGVSDQLTGNINYACQG-IDCGPIQGGACFPNTVRAHAAIYVMNLYQSAGRNSWNCDFS	438
Pera	TPGKFAGAKFPSTPATPTTFVAGGKKWCVKSAASNQALQSNIDYVCSGT-VDCSKIQGGACFPN-DVRARASYLMNAYYQANGRHDFDCDFS	435
<i>A. thaliana</i>	TPLTGFNLPLKPTNNVPYKQGVWCVPEGANETELETLMACASQNTTCAALAPGRECYEPVSIYWHASALNSYNAQFRNQSIQCFPFGLAH	460
Látex	STEHNATILFLKSDM-----	374
Banana	-----	-
Tomate	ITNSTASSLTSEI-----	360
Cebada	-----	-
Fra e 9.01	GTGAVTSSDPSNGSCSFLS---	461
Olivo	QTATLNTNPSYGACNFPSSGN	460
Pera	GSQITTTDPSSHGSCKYNA---	454
<i>A. thaliana</i>	ETTTNPGNDRCKFPSTVL----	478
Látex	-----	-
Banana	-----	-
Tomate	-----	-
Cebada	-----	-
	% I % S	

B

Dominio catalítico			Dominio de unión a carbohidratos		
Dominio N-terminal			CtD		
Dominio N-terminal			CtD		
NtD	% I	% S	CtD	% I	% S
Fra e 9.01					
Olivo	39	60	Olivo	56	71
Pera	60	76	Pera	60	79
<i>A. thaliana</i>	38	54	<i>A. thaliana</i>	26	44
Látex	31	51			
Banana	33	53			
Tomate	34	52			
Cebada	34	53			

**FIGURA 39. Alineamiento de Fra e 9 con  $\beta$ -1,3-glucanasas de origen vegetal.** Olivo (Ole e 9, Q94G86), pera (B9VQ36), *A. thaliana* (A6, Q06915), látex (Hev b 2, A2TJX4), banana (Mus a 5, A7U7Q7), tomate (Q01413), cebada (P15737). Los códigos de acceso indicados pertenecen a Uniprot. **A**, Los guiones indican huecos; el sombreado negro, residuos conservados en todas las secuencias; el sombreado gris oscuro residuos conservados en al menos 6 secuencias y el gris claro los conservados en 5. %I y %S representan porcentajes de identidad y similitud de secuencia, respectivamente, en comparación con Fra e 9. **B**, Comparación de los dominios N-terminal y C-terminal de  $\beta$ -1,3-glucanasas con Fra e 9 considerando la proteína madura.

#### 1.4. Expresión recombinante de NtD-Fra e 9 y CtD-Fra e 9

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas pertenecen al grupo 2 de proteínas de defensa (PR-2) y se incluyen en la familia 17 de la superfamilia de enzimas glicosil-hidrolasas. Según la longitud de su cadena polipeptídica se han descrito dos tipos de  $\beta$ -1,3-glucanasas: i) *glucanasas cortas* (33-41 kDa y un dominio), y ii) *glucanasas largas* ( $\approx$  45 kDa y dos dominios). Hasta la fecha tan solo un número reducido de glucanasas procedentes del reino vegetal se han expresado como proteínas recombinantes, destacando entre ellas la procedente de una subespecie de cebada del Tíbet (*Hordeum vulgare subsp. vulgare*) expresada en *P. pastoris* [Yu y col., 2003], la isoforma GII de cebada expresada como proteína de fusión en *E. coli* [Chen y col., 1995], las  $\beta$ -1,3-glucanasas alergénicas Hev b 2 de látex [Yip y col., 2000] y Mus a 5 de plátano [Peumans y col., 2000] -ambas *cortas* y expresadas en *E. coli*- y la  $\beta$ -1,3-glucanasa *larga* de polen de olivo, Ole e 9, cuyos dominios han sido expresados de manera independiente en la levadura *P. pastoris* [Palomares y col., 2003; Palomares y col., 2005]. Sin embargo, diversas  $\beta$ -1,3-glucanasas largas de bacteria como la de *Oerskovia xanthineolytica* [Shen y col., 1991] o la de *Streptomyces* sp. S27 [Shi y col., 2010] se han conseguido expresar completas en *E. coli*, ya que al tratarse de proteínas de origen procariota, el utilizar una bacteria para la producción recombinante garantiza un correcto plegamiento de las mismas a pesar del patrón de tres puentes disulfuro presente en el dominio C-terminal.

Los DNA codificantes del dominio N-terminal (residuos 30 a 349) y del dominio C-terminal (residuos 350 a 461) de Fra e 9 se utilizaron en la producción recombinante de las correspondientes proteínas como dominios independientes en los sistemas de expresión heterólogos *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente.

##### 1.4.1. Expresión y purificación de rNtD-Fra e 9

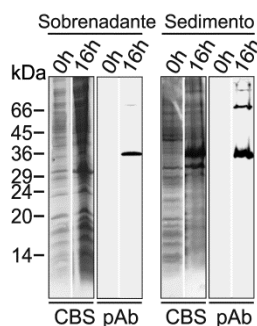
Para la expresión de **rNtD-Fra e 9** se utilizó el vector pET11b. En el sistema pET, la secuencia de interés introducida en el vector es transformada en *E. coli* y



transcrita bajo el control del promotor del fago T7. Se trata de un sistema de expresión inducible por IPTG con una transcripción muy activa que va a generar un elevado número de copias del gen de interés, convirtiéndose la proteína resultante en mayoritaria en el transcurso de unas pocas horas.

La estrategia de clonación del dominio N-terminal en el vector pET11b, así como los detalles referentes a la expresión y purificación de la proteína recombinante, quedan recogidos en el apartado de Materiales y Métodos. Al cDNA de NtD-Fra e 9 se le incluyó en el extremo 3' la secuencia codificante de seis histidinas para facilitar la purificación de la proteína expresada mediante cromatografía de afinidad a níquel -en una columna HisTrap FF Crude-. Una vez clonado el cDNA de NtD-Fra e 9 en el vector de expresión, la construcción resultante se introdujo en células de la cepa BL21-Gold(DE3) de *E. coli* mediante transformación por choque térmico. Las células transformantes se seleccionaron en presencia del antibiótico ampicilina y se realizaron pruebas de expresión de la proteína en varias colonias. Se seleccionó aquella colonia que mostró una mayor cantidad de proteína soluble expresada y con ella se optimizaron las condiciones de la expresión, ensayando distintos tiempos (2, 4, 6 y 16 h) y temperaturas de inducción (20 °C y 25 °C) con 0.2 y 0.4 mM del inductor IPTG. La expresión a gran escala -en un litro de medio de cultivo- de la proteína recombinante se realizó mediante la inducción del cultivo con 0.4 mM de IPTG durante 16 h a 20 °C.

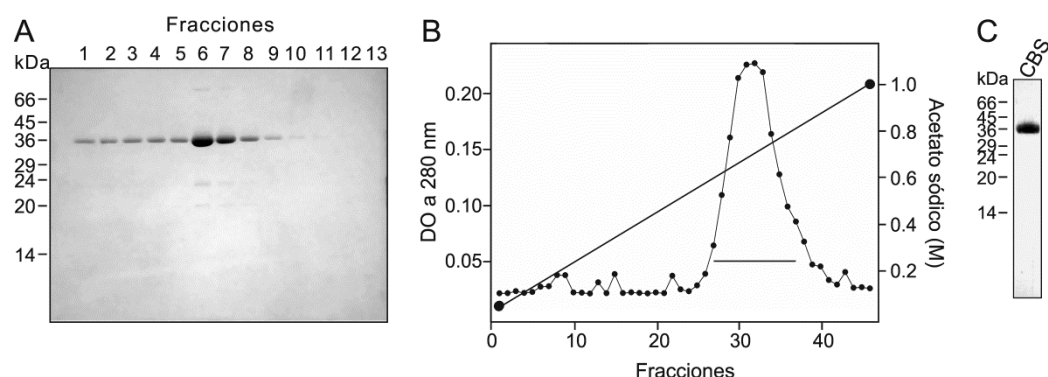
Aunque la mayor parte de rNtD-Fra e 9 se obtuvo principalmente formando parte de cuerpos de inclusión, esta proteína de alrededor de 36 kDa se encontró también presente en la fracción soluble tras 16 h de inducción con IPTG (FIG. 40).



**FIGURA 40. Expresión de rNtD-Fra e 9 en *E.coli* tras 16 h de inducción con IPTG.** Sobrenadante y sedimento del cultivo de la colonia seleccionada para la expresión a gran escala de rNtD-Fra e 9 a 0 h y 16 h de inducción con 0.4 mM de IPTG a 20 °C. Tinción con azul de Coomassie (CBS) y con el pAb anti-Histaq (pAb) tras PAGE-SDS del sobrenadante y el sedimento obtenidos después la lisis.

Tras diversos intentos de purificar sin éxito la proteína de los cuerpos de inclusión mediante solubilización y desnaturalización de la misma en urea 8 M/tiourea 6 M y posterior renaturalización mediante sustitución del tampón por diálisis o de manera rápida con el sistema de filtración por centrifugación de Amicon, se optó por trabajar con la proteína procedente de la fracción soluble.

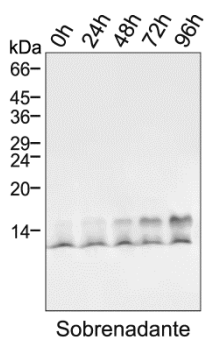
La proteína obtenida en la fracción soluble por lisis celular -en tampón Tris-HCl 50 mM y 100 mM PMSF-, se dializó exhaustivamente frente Tris-HCl 50 mM para eliminar pigmentos y otros contaminantes de baja masa molecular. La proteína dializada se purificó mediante dos etapas cromatográficas en FPLC. La primera consistió en una cromatografía de afinidad en columna de níquel (His Trap FF Crude) eluyendo la proteína mediante un gradiente de 20 mM a 0.5 M de imidazol (FIG. 41A). Una segunda etapa cromatográfica era necesaria para elevar el grado de pureza de la proteína recombinante. Dicha etapa consistió en una columna de intercambio catiónico (HiTrap CM FF), cuyo perfil se muestra en la figura 41B valiéndose del carácter básico de NtD-Fra e 9. Esta etapa cromatográfica se realizó en gradiente de 50 mM a 1 M de acetato sódico pH 5.0.



**FIGURA 41. Etapas de purificación de rNtD-Fra e 9 expresado en *E.coli*.** A, PAGE-SDS de las fracciones eluidas de la columna de afinidad de níquel y tinción con azul de Coomassie y B, perfil de elución tras cromatografía de intercambio catiónico, donde se señalan las fracciones seleccionadas. C, Análisis en PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie de rNtD-Fra e 9 tras la última etapa de purificación.

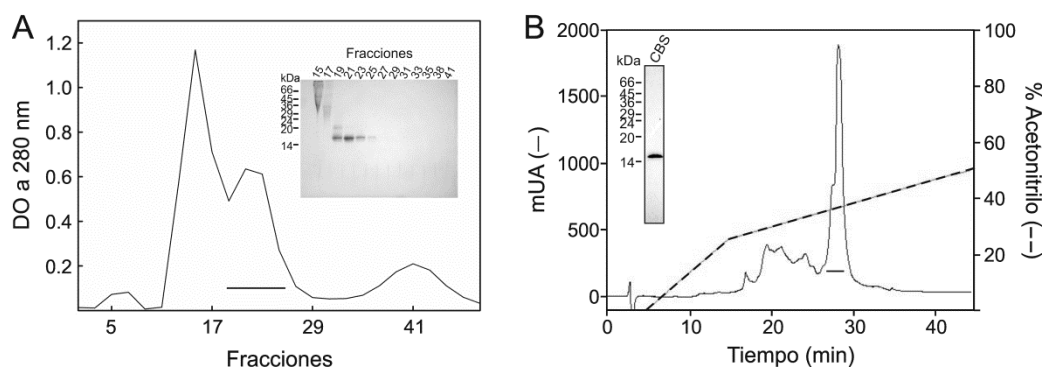
### 1.4.2. Expresión y purificación de rCtD-Fra e 9

La expresión de **rCtD-Fra e 9** en *P. pastoris* se llevó a cabo tras clonar su cDNA - en el vector de expresión pPICZ $\alpha$ A- en fase con el promotor de la enzima alcohol oxidasa inducible con metanol, y en fase con el gen codificante del factor  $\alpha$  que permite la secreción de la proteína al medio extracelular. El cDNA a expresar contenía la secuencia codificante correspondiente al péptido de unión entre los dos dominios de Fra e 9. Con esta construcción, linealizada con la enzima de restricción *Bst*XI, se transformaron células KM71 de *P. pastoris* por electroporación, consiguiendo así insertar el cDNA de CtD-Fra e 9 en el genoma de la levadura. Para la selección de células transformantes se utilizó el antibiótico zeocina, cuyo gen de resistencia está presente en el plásmido pPICZ $\alpha$ A. Se realizaron pruebas de expresión de varias colonias transformantes para seleccionar la que rindiese una mayor eficacia así como el tiempo de inducción adecuado. El crecimiento de dichas colonias a pequeña escala se llevó a cabo en medio líquido (BMGY) durante  $\approx 60$  h, tras las cuales se indujo la expresión de la proteína sustituyendo el medio por otro (BMMY) que contenía metanol como fuente de carbono. Con la colonia seleccionada se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante a gran escala. La proteína se obtuvo como proteína de secreción en el medio extracelular de *P. pastoris*, donde tras 48 h de inducción se detectó una banda con una movilidad electroforética de alrededor de 15 kDa (FIG. 42), obteniéndose la máxima expresión a las 96 h de inducción, sin detectar evidencias de agregación/degradación en PAGE-SDS.



**FIGURA 42. Expresión a gran escala de rCtD-Fra e 9 a distintos tiempos de inducción.** Tinción con azul de Coomassie de la fracción soluble obtenida tras centrifugación del cultivo de levadura después de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de inducción con metanol.

El sobrenadante del medio de cultivo se dializó exhaustivamente frente a bicarbonato 20 mM, se liofilizó y se aplicó en una columna de penetrabilidad Sephadex G-50 Fine (FIG. 43A), realizándose una etapa final de purificación en RP-HPLC (FIG. 43B).



**FIGURA 43. Etapas de purificación de rCtD-Fra e 9 expresado en *P. pastoris*.** **A**, Perfil de elución en columna de penetrabilidad Sephadex G-50 donde se señalan las fracciones seleccionadas y tinción con azul de Coomassie tras PAGE-SDS del eluido. **B**, Perfil de elución de rCtD-Fra e 9 en RP-HPLC donde se indica las fracciones recogidas y análisis en PAGE-SDS y tinción con azul de Coomassie de rCtD-Fra e 9 tras esta etapa de purificación.

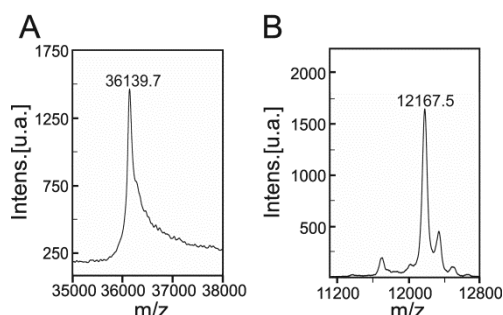
## 1.5. Caracterización de rNtD-Fra e 9 y rCtD-Fra e 9

### 1.5.1. Caracterización molecular

La masa molecular de los dominios recombinantes purificados se determinó mediante **espectrometría de masas** (FIG. 44) según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos.

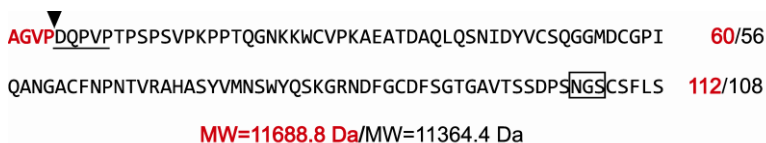
En el caso de rNtD-Fra e 9 se obtuvo un único pico correspondiente a una proteína con masa molecular de 36139.7 Da (FIG. 44A). Ese dato está de acuerdo con la masa molecular calculada en base a su composición de aminoácidos, que es de 36114.3 Da. La diferencia de 25.4 Da indica un correcto procesamiento de la proteína y

este incremento probablemente se deba una modificación postraducciona como puede ser una cianilación de una cisteína [Jeong y col., 2012].



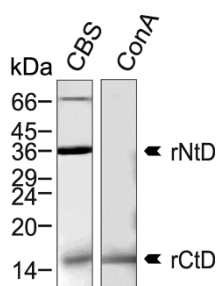
**FIGURA 44. Análisis por espectrometría de masas de los dominios de Fra e 9.** A, rNtD-Fra e 9 y B, rCtD-Fra e 9. u.a., unidades arbitrarias. m/z, relación masa/carga.

El análisis por espectrometría de masas de rCtD-Fra e 9 mostró un pico mayoritario de 12167.5 Da que difiere de la masa molecular teórica de 11688.8 Da calculada a partir de la secuencia deducida del clon (FIG. 44B). Se determinó mediante degradación de Edman el N-terminal de la proteína recombinante purificada, cuya secuencia corresponde a los aminoácidos DQPVP, lo que mostró una pérdida de los 4 primeros residuos (FIG. 45). Este resultado puede implicar que la proteína no ha sido correctamente procesada por *P. pastoris*, o ha sufrido una degradación durante el proceso de purificación. La masa molecular teórica considerando la secuencia expresada -sin los 4 residuos iniciales- resultó de 11364.4 Da, lo que supone una diferencia de 803.1 Da respecto al pico principal obtenido por espectrometría de masas. Esta diferencia podría indicar la presencia de un pequeño oligosacárido formado por un núcleo de 2 N-acetilglucosaminas y varios residuos de manosa (dato confirmado por RMN, comunicación personal de la Dra. Marta Bruix).



**FIGURA 45. Secuencia de aminoácidos de rCtD-Fra e 9.** En rojo se indican los aminoácidos que no están presentes en la proteína expresada, así como el número total de residuos y la masa molecular correspondiente a la proteína clonada. Tras la cabeza de flecha se muestra en negro la secuencia obtenida, así como el número de residuos y la masa molecular deducida de la proteína y se subrayan los aminoácidos obtenidos por degradación de Edman. Se recuadra el sitio potencial de N-glicosilación.

Para confirmar la presencia de azúcares en los dos dominios recombinantes, se realizó un **análisis de glicosilación** de ambas moléculas. Las dos proteínas purificadas fueron aplicadas en el mismo pocillo de un gel de poliacrilamida, separadas mediante PAGE-SDS y transferidas a membrana y se llevó a cabo la tinción con ConA, lectina que une de manera específica residuos de manosa (FIG. 46). En concordancia con el resultado de la espectrometría de masas, rCtD-Fra e 9 está glicosilado, mientras que rNtD-Fra e 9, a pesar de presentar un sitio potencial de N-glicosilación, muestra un resultado negativo probablemente por estar expresado en *E. coli*.

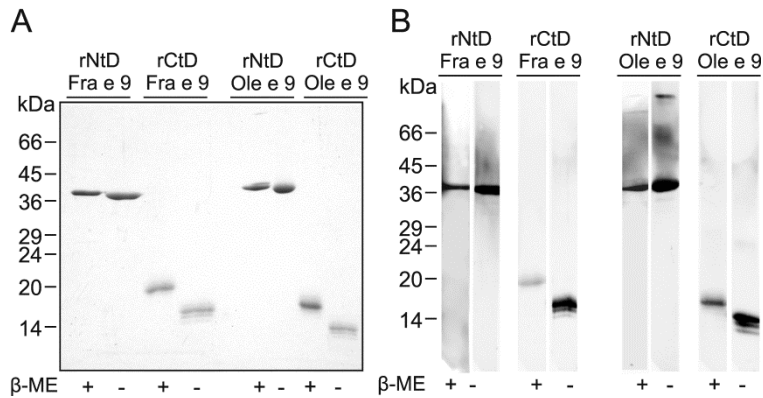


**FIGURA 46.** Tinción de rNtD y rCtD-Fra e 9 con Con A y con azul de Coomassie (CBS).

Se analizó el efecto inducido por **agentes reductores** en la movilidad electroforética en PAGE-SDS de los dominios recombinantes purificados de Fra e 9 y se comparó con el efecto inducido sobre los dominios de Ole e 9 (FIG. 47A). Para ello las distintas proteínas se trataron con  $\beta$ ME y calentamiento durante 10 min a 90 °C y se comparó el resultado con las muestras sin reducir. Tras PAGE-SDS se transfirieron las proteínas a membrana para analizar también la capacidad de reconocimiento por IgEs de una mezcla de sueros de pacientes dirigidas a Ole e 9 (FIG. 47B).

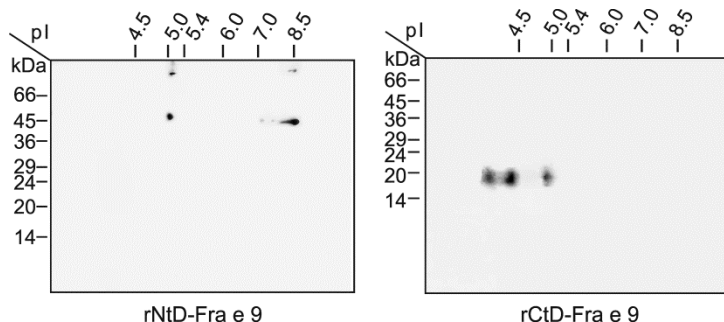
El tratamiento con  $\beta$ ME produjo una disminución de la movilidad electroforética en los dominios de ambas, especialmente significativa en los rCtDs (FIG. 47A), así como una disminución en la unión de IgEs de los dominios de ambas proteínas, principalmente también en los rCtDs (FIG. 47B). La pérdida de reconocimiento por IgE estaría indicando un cambio en la estructura terciaria -y por

tanto de epítopos conformacionales- debido a la acción del agente reductor que actuaría sobre los puentes disulfuro.



**FIGURA 47. Análisis en PAGE-SDS de los dominios recombinantes de Fra e 9 y Ole e 9 en presencia o ausencia de  $\beta$ -ME. A,** Tinción con azul de Coomassie. **B,** Tinción con mezcla de sueros de pacientes alérgicos a Ole e 9. Muestras en presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -ME.

El punto isoeléctrico experimental de ambas proteínas recombinantes purificadas fue determinado mediante **electroforesis bidimensional**. Para ello, en la primera dimensión se separaron las proteínas en función de su punto isoeléctrico en tiras de gel de gradiente de pH lineal (pH 3-10) en presencia del agente reductor TBP. En la segunda dimensión las muestras reducidas -DTT- y alquiladas -iodoacetamida- se sometieron a PAGE-SDS para la separación de las proteínas en función de su tamaño. Las proteínas se visualizaron por tinción argéntica (FIG. 48).



**FIGURA 48. Electroforesis bidimensional de rNtD y rCtD de Fra e 9 tras tinción argéntica.** Se aplica en cada tira de la primera dimensión 2.5  $\mu$ g de las respectivas proteínas purificadas.

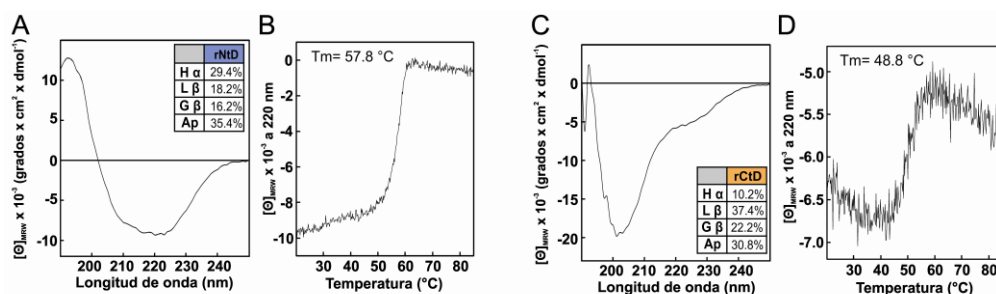
Los experimentos de electroforesis bidimensional mostraron dos manchas en el caso de rNtD-Fra e 9, una mancha entorno a un pI de 5.1 y otra alrededor de 8.6, y tres para rCtD-Fra e 9 entre 4.0 y 5.0. El pI teórico para rNtD-Fra e 9 es de 9.04 y el de rCtD-Fra e 9 de 5.56. En ambos casos se detectan manchas de pI más ácido que el teórico. La variante ácida de rNtD-Fra e 9 no debería aparecer, puesto que la proteína ha sido purificada mediante un intercambio catiónico, descartando los contaminantes ácidos de la preparación. En el caso de las dos variantes más ácidas de rCtD-Fra e 9, podría tratarse de la oxidación de una o dos metioninas de la molécula a sulfonas y/o sulfóxidos, o de alguna desaminación de Asn y/o Gln.

### **1.5.2. Caracterización espectroscópica**

Para analizar el plegamiento a nivel de estructura secundaria de ambos dominios purificados, se obtuvieron los **espectros de dicroísmo circular en el UV lejano**.

En la figura 49A se muestra el espectro de DC de rNtD-Fra e 9. A partir de este espectro se determinó el contenido en estructura secundaria del dominio: 29.4% hélice  $\alpha$ , 18.2% lámina  $\beta$ , 16.2% giro  $\beta$  y 35.4% de ordenación aperiódica, mediante el programa de análisis de estructura secundaria CDNN 2.1. Estos datos coinciden con los esperados para una estructura de TIM barrel, característica del dominio catalítico de  $\beta$ -1,3-glucanasas [Receveur-Brechot y col., 2006; Wojtkowiak y col., 2012]. La figura 49C representa el espectro de DC de rCtD-Fra e 9 que contiene 10.2 % hélice  $\alpha$ , 37.4% lámina  $\beta$ , 22.2% giro  $\beta$  y 30.5% de ordenación aperiódica, estos valores son semejantes a los obtenidos para Ole e 10 (17% hélice  $\alpha$ , 33% lámina  $\beta$ , 21% giro  $\beta$  y 29% de ordenación aperiódica) [Barral y col., 2005] o al domino C-terminal de Ole e 9 (16% hélice  $\alpha$ , 30% lámina  $\beta$ , 17% giro  $\beta$  y 37% de ordenación aperiódica) [Palomares y col., 2003] ambas moléculas pertenecientes a la familia de proteínas de unión a carbohidratos CBM43. Los espectros de DC de ambas proteínas indican que ambas están estructuradas.





**FIGURA 49.** Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano (190–250 nm) y curvas de desnaturalización térmica de los dos dominios de Fra e 9. Los espectros de dicroísmo (A y C) se registraron a  $20^{\circ}\text{C}$  y la desnaturalización térmica de rNtD (B) y rCtD (D) a 220 nm se monitorizó tras calentar de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $85^{\circ}\text{C}$ . Los valores se expresan como elipticidad molar por residuo,  $[\theta]$ . Los cálculos experimentales de estructura secundaria de cada uno de los dominios

La desnaturalización térmica se registró mediante los cambios de elipticidad molar a 220 nm durante el incremento de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  a  $80^{\circ}\text{C}$ , obteniéndose una  $T_m$  de  $57.8^{\circ}\text{C}$  para rNtD (FIG. 49B) y de  $48.8^{\circ}\text{C}$  para rCtD-Fra e 9 (FIG. 49D), respectivamente. Si comparamos estos valores con los obtenidos para los dominios recombinantes de Ole e 9, observamos en el caso del dominio N-terminal un valor de  $T_m$  relativamente próximo al de NtD-Ole e 9, que está determinado en  $50^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, el dominio C-terminal presenta una  $T_m$  de  $62^{\circ}\text{C}$  [Palomares y col., 2003],  $11.2^{\circ}\text{C}$  superior a la obtenida para el dominio homólogo en Fra e 9.

### 1.5.3. Predicción de estructura secundaria

La predicción teórica de estructura secundaria obtenida en base a la secuencia de aminoácidos de Fra e 9 completa, que permite asignar elementos de estructura secundaria a cada segmento de estructura primaria, dio como resultado 30.3% de hélice  $\alpha$ , 16.7% de lámina  $\beta$  y 53.0% de ordenación aperiódica. La figura 50 nos muestra la asignación de estructura secundaria a la secuencia de la proteína Fra e 9 madura. Si analizamos por separado cada dominio obtenemos 32% de hélice  $\alpha$ , 19.4% de lámina  $\beta$  y 47.8% de ordenación aperiódica para rNtD-Fra e 9, valores que se ajustan con bastante precisión a los obtenidos por DC, y concuerdan con el modelo 3D (FIG. 51A). Ambos métodos indican un menor contenido en lámina  $\beta$  que en hélice  $\alpha$  y

10 20 30 40 50 60 70 80  
 IGVNYGT LGNNLPPPAQVAQFLKEKTTIDRVKLFVDVNPDI LRAFGAGTFVAVTVPNGEIPNLVNMKNARRWVGDN IKFPYPQTKI  
 CCCCCCCCCCCCCC hhhhhhhhhhhhh ccc eeeee ccc hhhhhhhhh ccc eeeee ccc hhhh ccc hhhhhhhhhhhhh ccc ccc e

90 100 110 120 130 140 150 160 170  
 NYILVGNEVLHWGPQNLDINLVGAMRALHNALIRSGIQGVNVTTAHALSILESSDPPSLAKFRPGWDKGLDAPLTQLFQRQTKSPFM  
 eeeee ccc ccc ccc hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh ccc eeeee ccc eee ccc ccc ccc ccc ccc hhhhhhhhhhhhhhhhhhh ccc ee

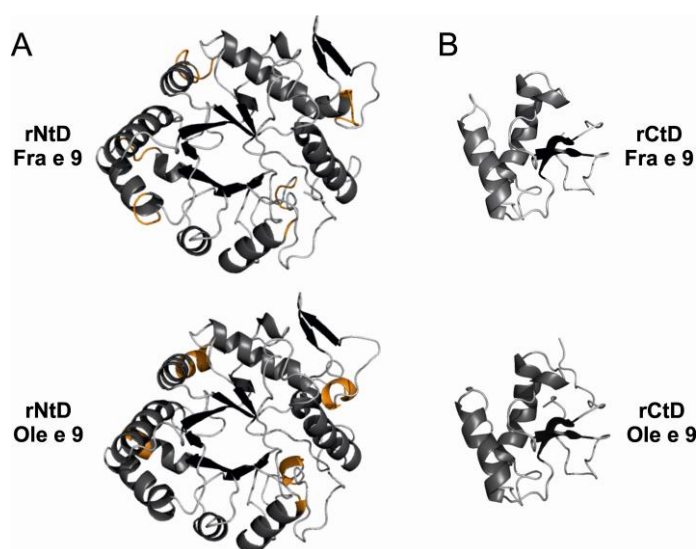
180 190 200 210 220 230 240 250  
 VNPYPYFGYSPEKADFA LKPNPGVTDKYTKKLYTNMFDQLIDSVYTS MKKLGYG DVEI AVGTG WASAGETFE PKCTIP NAASYN  
 eeee ccc eeee ccc ccc eee ccc ccc ccc hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh ccc eeeee ccc ccc ccc ccc ccc ccc hhhhhhhhh

260 270 280 290 300 310 320 330 340  
 GGLVKYKNQGTGTPLLPGRKFETYIFALFNENLKPGLSALERSFGLFQPDFTPVYDVGIMRGTAGVPDQPVPTSPSPVKPPTQGNKK  
 hhhhhhhhh ccc ccc ccc ccc ccc eeeee ccc ccc ccc ccc ccc ccc eee ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc

350 360 370 380 390 400 410 420 430  
 WCVPKAEATDAQLSNIDYVCSQGGMDCGPIQANGACFNPN TVRAHASVYMNWSYQSKGRNDFG CDFSGTGAVTSSDPSNGSCSFLS  
 eeee ccc ccc ccc hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh ccc ccc ccc ccc ccc ccc ccc hhhhhhhhhhhhhhhhhhh ccc ccc ccc ccc ccc ccc e

El **modelado 3D** de rNtD-Fra e 9 se realizó en base a la estructura 3D obtenida experimentalmente -mediante difracción de rayos X- de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de plátano [Peumans y col., 2000], mostrando un motivo  $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel. La comparación de esta estructura con la del dominio catalítico de la glucanasa Ole e 9 muestra conformaciones prácticamente idénticas, con ligeras diferencias, centradas en un mayor porcentaje de estructura aperiódica en rNtD-Fra e 9 (FIG. 51A, señalado en naranja). El centro catalítico se sitúa entre las hélices  $\alpha$  2 y 3 del extremo NH<sub>2</sub>-terminal de la cadena polipeptídica y entre las hélices  $\alpha$  5 y 6 del extremo COOH-terminal de la cadena.

El modelado de CtD-Fra e 9 se realizó utilizando las coordenadas de la estructura de rCtD-Ole e 9 determinada por RMN [Treviño y col., 2008]. La estructura consiste en dos hélices  $\alpha$  y una pequeña lamina  $\beta$  antiparalela conectado todo ello por diversos lazos de estructura ordenada aperiódica (FIG. 51B). El principal tipo de estructura secundaria ordenada repetitiva de esta molécula es la hélice  $\alpha$ , dato que concuerda con los resultados obtenidos mediante la predicción de estructura secundaria a partir de la secuencia de dicha molécula.



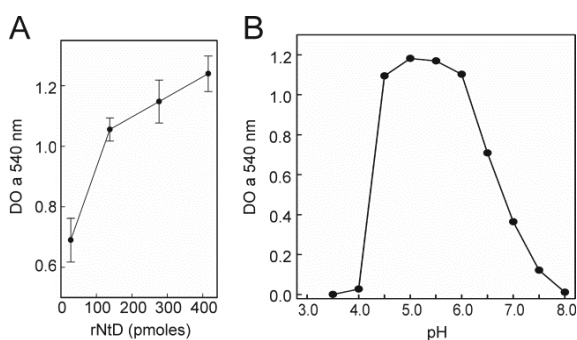
**FIGURA 51. Representación esquemática de la estructura 3D de Fra e 9 y Ole e 9.** A, Modelado de los dominios NtD de glucanasas de fresno y olivo en base a la estructura de Mus a 5 (PDB 2CYG). En naranja se indican las principales regiones con diferencias en estructura secundaria. B, Modelado del dominio CtD de Fra e 9 y representación 3D de CtD-Ole e 9 (PDB 2JON) basada en datos experimentales.

## 2. ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE rNtD Y rCtD DE Fra e 9

### 2.1. Actividad $\beta$ -1,3-glucanasa del dominio catalítico de Fra e 9

El mecanismo catalítico propuesto para la hidrólisis glicosídica mediada por las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas en cebada consiste en la protonación de los átomos de oxígeno glicosídicos, actuando como ácido débil el Glu-288 del centro activo y como nucleófilo estabilizante el Glu-231 [Chen y col., 1995]. El centro activo lo forman una tétrada de aminoácidos ionizables, que en Fra e 9 corresponden a las siguientes posiciones: Glu-235, Glu-289, Lys-292 y Glu-298, equivalentes a los residuos Glu-231, Glu-279, Lys-282 y Glu-288 de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de cebada.

Al estar conservados los residuos implicados en la catálisis enzimática, procedimos a determinar la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de rNtD-Fra e 9 frente a distintos sustratos mediante un ensayo colorimétrico basado en la medida de los equivalentes de glucosa reducidos liberados durante la reacción enzimática. rNtD-Fra e 9 exhibe actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa puesto que es capaz de hidrolizar laminarina. Para determinar la cantidad óptima de rNtD-Fra e 9 a emplear en los estudios posteriores, se testaron diferentes cantidades de enzima a concentración de sustrato constante y elevada -2 mg/ml laminarina- (FIG. 52A).



**FIGURA 52. Actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa de rNtD-Fra e 9. A,** Determinación de la cantidad óptima de enzima (rNtD-Fra e 9) a una concentración constante de 2 mg/ml de laminarina. La liberación de glucosa procedente de laminarina se monitorizó colorimétricamente como absorbancia a 540 nm. **B,** Dependencia del pH de la actividad enzimática de rNtD-Fra e 9.

Se determinó en 138 pmoles la cantidad adecuada de rNtD-Fra e 9, puesto que a partir de este punto el hecho de doblar la concentración de enzima ensayada suponía tan solo un incremento de la DO de un 6.5% (FIG. 52A).

La actividad de rNtD-Fra e 9 se mantiene relativamente constante entre pH 4.5 y 6.0 (FIG. 52B), mostrando un valor máximo de 959.42  $\mu$ g de glucosa liberada/min/ $\mu$ mol de proteína a pH 5.0. Se determinó también la actividad enzimática a pH 5.0 del homólogo de rNtD-Fra e 9 en olivo, rNtD-Ole e 9, para el cual se obtuvieron valores de actividad del orden de 200 veces inferiores a los de Fra e 9. Si comparamos la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa entre aquellas descritas como básicas y las de pl ácido, a las primeras se les atribuye una actividad enzimática que puede ser entre 50 y 250 veces mayor que la de las segundas, presentando un valor máximo a pH 4.5, y siendo activas en un estrecho rango de pH (entre 4.0 y 5.5) [Chen y col., 1995]. Estos datos bibliográficos concuerdan con los obtenidos para los dominios catalíticos de Fra e 9, básico (pl 8.33), y Ole e 9, ácido (pl 5.62), cuyas diferencias en pl podrían explicar la distinta actividad hidrolítica que entre ellas se observa.

## 2.2. Actividad antifúngica de rNtD-Fra e 9

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas se engloban dentro del grupo 2 de proteínas relacionadas con patogénesis. Se ha descrito actividad antifúngica *in vitro* en diversas  $\beta$ -1,3-glucanasas tanto de plantas [Mauch y col., 1988; Yi y col., 1997; Thanseem y col., 2005; Liu y col., 2009; Silvar y col., 2009] como de bacterias [Shi y col., 2010], pero dicha función biológica no es inherente a estas enzimas, ya que las hay que carecen de la misma [Peumans y col., 2000].

Se evaluó la actividad antifúngica de rNtD-Ole e 9 y rNtD-Fra e 9 purificados con los *F. oxysporum*, *A. niger*, *A. ochraceus* y *A. flavus* (FIG. 53).



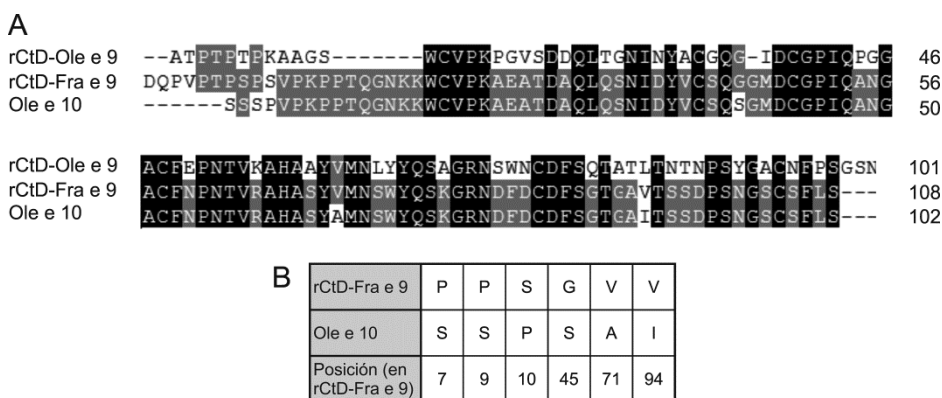
**FIGURA 53. Efecto de rNtD-Ole e 9 y rNtD-Fra e 9 sobre el crecimiento de hongos.** 25  $\mu$ g de rNtD-Ole e 9 está aplicado en los discos de papel de filtro situados en la derecha de cada una de las placas y 25  $\mu$ g rNtD-Fra e 9 en los de la izquierda.

Ninguna de las dos moléculas fue capaz de inhibir el crecimiento de los hongos testados, sin embargo en la placa de *A. flavus*, así como en la de *A. niger* en menor medida se observa un halo de esporulación en el disco que contiene rNtD-Fra e 9. El mecanismo de esporulación de los hongos puede verse favorecido en condiciones adversas. Se ha sugerido incluso que, determinadas  $\beta$ -1,3-glucanasas como la codificada por el gen GLU1 de *Pyrenophora tritici-repentis*, podrían jugar un papel importante en la virulencia del hongo [Fu y col., 2013].

### 2.3. Unión de rCtD-Fra e 9 a carbohidratos

Los CBMs constituyen en ocasiones proteínas independientes, tal y como ocurre con el alérgeno Ole e 10 en polen de olivo [Barral y col., 2005], la proteína de unión a quitina CBP21 procedente de *Serratia marcesens* [Vaaje-Kolstad y col., 2005] o las proteínas E7 y E8 de *Thermobifida fusca* [Moser y col., 2008]. Sin embargo, tal y como consta en la base de datos CAZY, muchos de los CBMs representan un dominio de una estructura proteica mayor. Dependiendo del tipo de ligando que reconocen y en función de la topología del sitio de interacción, los CBMs se clasifican en Tipo A, B, o C [Guillén y col., 2010]. Los de Tipo A y B presentan variaciones en la especificidad de sustrato dependiendo de la planta y el tejido donde se encuentren [Blake y col., 2006].

La similitud de secuencia entre el dominio C-terminal de Fra e 9 con su homólogo en Ole e 9 y con Ole e 10 (FIG. 54), nos llevó a analizar la capacidad de unión a carbohidratos solubles de rCtD-Fra e 9, tal como se hubo realizado con Ole e 10 en estudios anteriores [Barral y col., 2005] y con Ole e 9 [Rodríguez y col., 2007]. Esta actividad se ensayó mediante electroforesis de afinidad en geles de poliacrilamida (AGE) en condiciones no desnaturalizantes. Gracias a este ensayo se pudo evaluar la interacción de una proteína con los carbohidratos embebidos en la matriz del gel de poliacrilamida, observándose un retardo de movilidad de la misma cuando se produzca interacción con el sustrato. Estos experimentos se desarrollaron polimerizando los geles de poliacrilamida en presencia de diversos carbohidratos, con longitud y tipo de enlace variable (TABLA 10) tal y como se detalla en Materiales y Métodos.

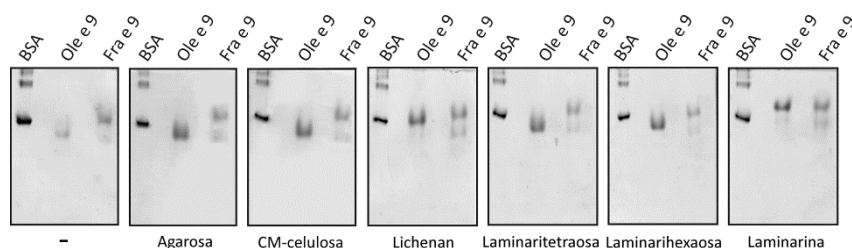


**FIGURA 54. Alineamiento de rCtD-Fra e 9, rCtD-Ole e 9 y Ole e 10. A,** Sombreado en gris los residuos idénticos en dos secuencias y en negro los residuos en las tres secuencias. **B,** Cambios aminoacídicos de Ole e 10 respecto de la secuencia de rCtD-Fra e 9 indicando su posición en la secuencia de rCtD-Fra e 9.

	Estructura
Laminarina	(1,3- $\beta$ -glucano) <sub>23-27</sub>
Laminarihexaosa	(1,3- $\beta$ -glucano) <sub>6</sub>
Laminaritetraosa	(1,3- $\beta$ -glucano) <sub>4</sub>
Agarosa	(1,3/1,4- $\alpha$ -galactosa) <sub>n</sub>
CM-celulosa	(1,4- $\beta$ -glucano) <sub>n</sub>
Lichenan	(1,3/1,4- $\beta$ -glucano) <sub>n</sub>

**TABLA 10. Carbohidratos utilizados en los ensayos de AGE.** Se indica fuera del paréntesis el número de residuos que componen el carbohidrato; n, indica un polisacárido de elevada longitud de cadena.

Se utilizó BSA como control de no interacción y una concentración de 2.5 mg/ml de los diferentes sustratos. De todos los carbohidratos testados, rCtD-Fra e 9 fue capaz de unir de manera significativa laminarina. rCtD-Fra e 9 mostró una capacidad de unión a laminarina inferior a la de rCtD-Ole e 9 (FIG. 55) tal y como indica su cambio de movilidad menos drástico respecto al control sin ligando. En cuanto a los demás carbohidratos ensayados, rCtD-Fra e 9 exhibió un cambio sutil de movilidad en presencia de lichenan (1,3/1,4- $\beta$ -glucano), menor que el experimentado en presencia de laminarina. La especificidad de unión de rCtD-Fra e 9 resultó ser similar a la de rCtD-Ole e 9, ya que ambos dominios unen 1,3- $\beta$ -glucanos y 1,3/1,4- $\beta$ -glucanos de elevada longitud de cadena.



**FIGURA 55. Análisis mediante AGE de la interacción de los dominios C-terminales de glucanasa de fresno y olivo con distintos carbohidratos.** rCtD-Ole e 9 (2  $\mu$ g), rCtD-Fra e 9 (2  $\mu$ g) y BSA (0.7  $\mu$ g) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida en ausencia de SDS y bajo condiciones no reductoras, en presencia (2.5 mg/ml) o ausencia de polisacárido (-).

La determinación del grado de interacción ( $K_D$ ) de rCtD-Fra e 9 con laminarina (FIG. 56A) o lichenan (FIG. 57A) se midió mediante AGE cuantitativa, utilizando concentraciones crecientes de los distintos ligandos. Se seleccionaron en particular los citados sustratos por ser aquellos con los que los dos rCtDs mostraron mayor capacidad de unión.

La constante de disociación se obtuvo representando la distancia de migración relativa ( $1/(R-r)$ ) frente a la concentración de ligando ( $1/C$ ) en una representación de inversos. El valor de  $K_D$  se calculó utilizando la siguiente ecuación [Bolam y col., 2004]:



$$1/(R-r) = 1/(R-R_c) (1 + K_D/C)$$

Donde:

$r$ : distancia de migración de la proteína en el gel en presencia de ligando

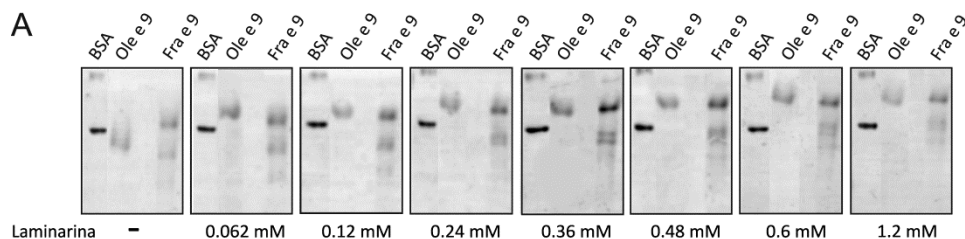
$R$ : distancia de migración de la proteína en el gel en ausencia de ligando

$R_c$ : migración del complejo en exceso de ligando

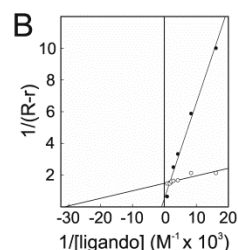
$C$ : concentración de ligando en el gel (molaridad por unidad de glucosa)

$K_D$ : constante de disociación

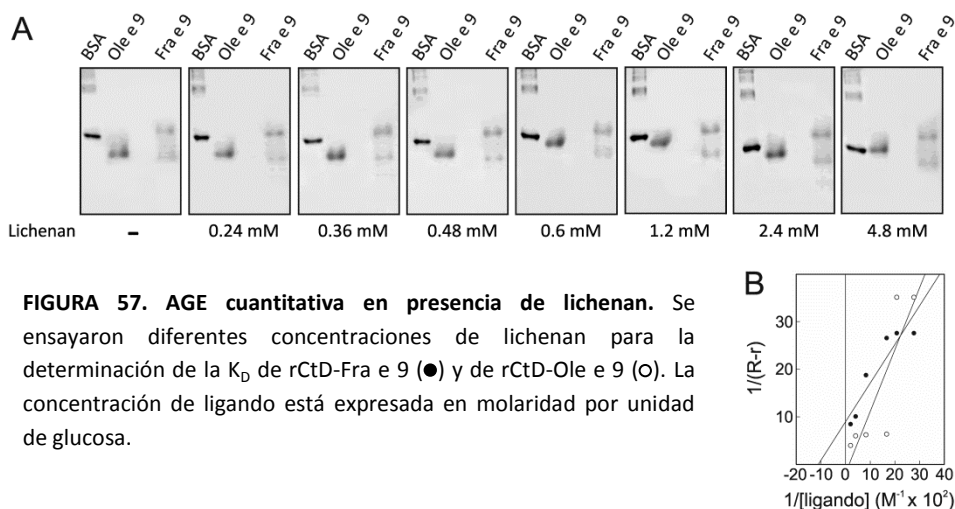
El valor de  $K_D$  se obtiene del inverso del valor absoluto del corte con el eje de abscisas de la recta obtenida. Se calcularon las distancias de migración tomando como referencia la migración de BSA en cada caso.



**FIGURA 56. AGE cuantitativa en presencia de laminarina.** Se ensayaron diferentes concentraciones de laminarina para la determinación de la  $K_D$  de rCtD-Fra e 9 (○) y de rCtD-Ole e 9 (●). La concentración de ligando está expresada en molaridad por unidad de glucosa.



Los valores de  $K_D$  obtenidos con laminarina fueron de 1.1 mM para rCtD-Fra e 9 y 0.032 mM para rCtD-Ole e 9 (FIG. 56B). Este resultado confirma la mayor afinidad de rCtD-Ole e 9 por laminarina. Cabe destacar que la afinidad de rCtD-Fra e 9 por laminarina es más similar a la de Ole e 10 ( $K_D=4.9$  mM) [Barral, 2005] que a la de su dominio homólogo en polen olivo.



**FIGURA 57. AGE cuantitativa en presencia de lichenan.** Se ensayaron diferentes concentraciones de lichenan para la determinación de la  $K_D$  de rCtD-Fra e 9 (●) y de rCtD-Ole e 9 (○). La concentración de ligando está expresada en molaridad por unidad de glucosa.

Los valores de  $K_D$  para lichenan obtenidos a partir de las representaciones gráficas de la figura 57B fueron de 0.9 mM para rCtD-Fra e 9 y de 6.99 mM para rCtD-Ole e 9.

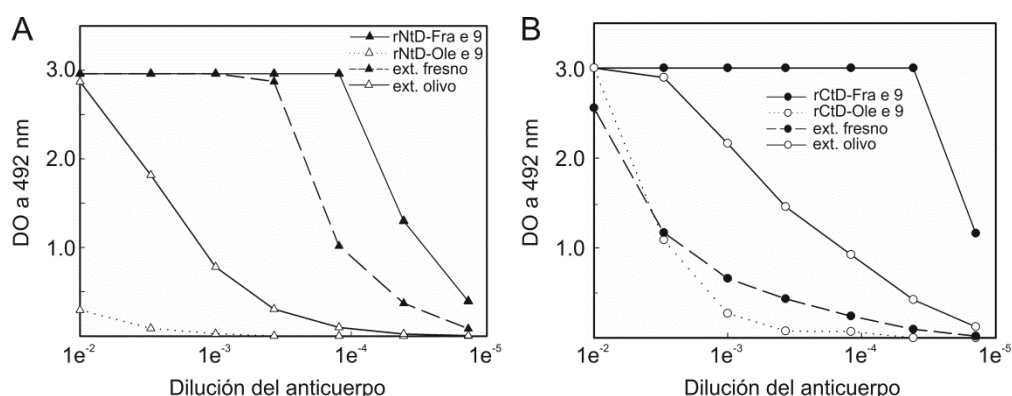
Estos datos parecen indicar una mayor especificidad de Ole e 9 por  $\beta$ -1,3-glucanos, ya que la afinidad por laminarina es unas 50 veces superior a la mostrada por lichenan, mientras que en el caso de Fra e 9, la afinidad por 1,3/1,4- $\beta$ -glucanos de elevado número de unidades es equivalente a la obtenida para  $\beta$ -1,3-glucanos de elevada longitud como la laminarina.

### 3. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE rNtD Y rCtD de Fra e 9

#### 3.1. Titulación del anticuerpo policlonal específico de cada uno de los dominios de Fra e 9

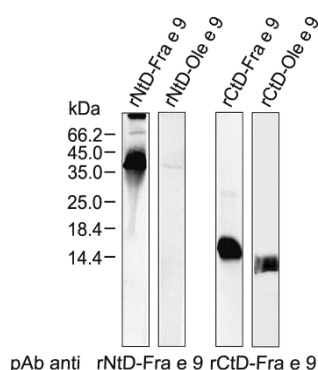
Los anticuerpos policlonales para ambos dominios recombinantes se obtuvieron tras la inmunización de conejos New Zealand, como se detalla en Materiales y Métodos.

La afinidad y especificidad de los pAbs se analizó con los dominios recombinantes de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de polen de fresno y olivo, así como con los extractos proteicos de estos mismos pólenes, mediante un ensayo de titulación en ELISA (FIG. 58).



**FIGURA 58. Titulación en ELISA de pAbs frente a los dominios de Fra e 9.** A, pAb anti-rNtD Fra e 9 y B, pAb anti-rCtD Fra e 9. Ambos anticuerpos se titularon con sus respectivos dominios de Fra e 9 y Ole e 9, así como con los extractos de polen de fresno y olivo.

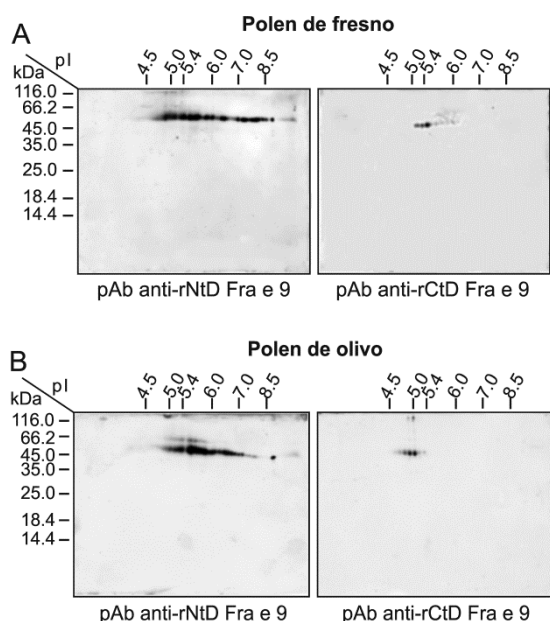
El título del pAb anti-rNtD-Fra e 9 en ELISA fue de 1:20000 para rNtD-Fra e 9, 1:8000 para el extracto de fresno, 1:700 para el extracto de olivo e inferior a 1:100 para rNtD-Ole e 9. El título del pAb anti-rCtD-Fra e 9 en ELISA se determinó en 1:90000 para rCtD-Fra e 9, 1:5000 para el extracto de olivo y 1:400 para rCtD-Ole e 9 y el extracto de fresno. Se estableció en 1:5000 la dilución para ambos pAbs (FIG. 59).



**FIGURA 59. Inmunotinción de los dominios de Fra e 9 y Ole e 9 con los respectivos pAbs de Fra e 9.** Se aplica 1  $\mu$ g de cada proteína. Dilución 1:5000 de los pAbs utilizados.

### 3.2. Epítopos IgG e IgE de Fra e 9 están presentes en los extractos de polen de fresno y olivo

Para identificar isoformas, los extractos de fresno y olivo se separaron en geles 2D y se testaron con los pAbs específicos frente a rNTD y a rCTD de Fra e 9. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con el objetivo de poder comparar las isoformas detectadas en polen de fresno y olivo por los pAbs (FIG. 60).

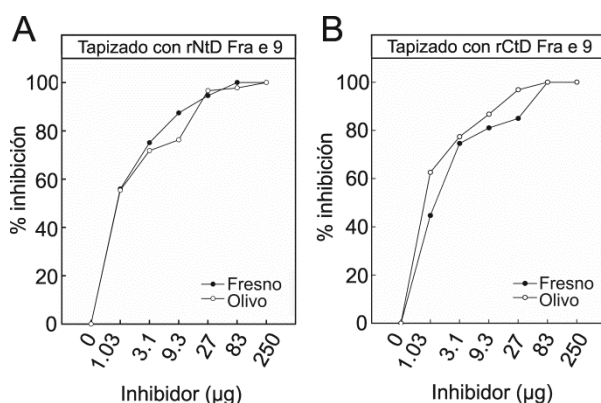


**FIGURA 60. Reconocimiento de isoformas de  $\beta$ -1,3-glucanasas en extractos de polen de fresno y olivo.** Detección mediante electroforesis bidimensional con los pAbs anti-rNTD-Fra e 9 y anti-rCTD-Fra e 9, **A**, en extractos de polen de fresno y **B**, de olivo.

Si comparamos el reconocimiento del pAb frente a rNtD-Fra e 9 en ambos extractos, vemos un amplio espectro de isoformas con pI entre 4.8 y 9.0. El extracto de polen de fresno muestra una mayor concentración de isoformas básicas detectadas por el pAb anti-rNtD Fra e 9 que el de polen de olivo (FIG. 60). El pAb anti-rCtD-Fra e 9 reconoce principalmente tres isoformas en ambos extractos y estas son ácidas, con un pI en torno a 5.4 en polen de fresno y a 5.0 en polen de olivo. El reducido número de isoformas detectadas con el pAb anti-rCtD-Fra e 9, en comparación con el dirigido al dominio N-terminal de esta misma molécula, podría deberse a la pérdida de epítomos conformacionales del dominio C-terminal al ser sometido a un agente reductor que estaría actuando sobre los puentes disulfuro que presenta este dominio.

Las distintas isoformas de glucanasas podrían tener diferentes funciones en la planta, por lo que sería deseable llevar a cabo un abordaje que permitiese la asociación de estas isozimas -con actividad glucanasa- con el papel fisiológico que desempeñan.

Para comprobar si los dominios recombinantes de Fra e 9 compartían epítomos IgE con  $\beta$ -1,3-glucanasas presentes en los extractos de fresno y olivo, se realizaron ensayos de ELISA de inhibición cruzada. Estos ensayos consistieron en tapizar las placas de ELISA con los dominios de Fra e 9 por separado e inhibir la unión de IgE de pacientes sensibilizados a Ole e 9; utilizando para ello los extractos de polen de fresno o de olivo (FIG. 61). Se ensayaron cantidades crecientes de inhibidor, llegando en todos los casos a un 100% de inhibición de la respuesta IgE dirigida frente a ambos dominios de Fra e 9 con la máxima cantidad ensayada de ambos pólenes (250  $\mu$ g) (FIG. 61A y B). Demostrado el hecho de que todos los epítomos IgE de rNtD y rCtD de Fra e 9 están contenidos en los extractos de los pólenes de fresno y olivo, podemos concluir que las  $\beta$ -1,3-glucanasas en los pólenes de fresno y olivo comparten epítomos IgE.



**FIGURA 61. Ensayos de inhibición en ELISA de la unión de IgE a los dominios de Fra e 9.** Se preincubó una mezcla de sueros de pacientes alérgicos con cantidades crecientes (0-250 µg) de extracto proteico de polen de fresno y olivo como inhibidores.

### 3.3. Reactividad cruzada entre polen de fresno y olivo a través de los dominios recombinantes de las $\beta$ -1,3-glucanasas Fra e 9 y Ole e 9

Fra e 9 es la segunda  $\beta$ -1,3-glucanasa estudiada perteneciente a la familia de las Oleáceas. En comparación con Ole e 9, su homólogo en polen de olivo, que se trata de una  $\beta$ -1,3-glucanasa ácida con baja actividad enzimática, y elevada especificidad por  $\beta$ -1,3-glucanos, Fra e 9 es una enzima básica con una capacidad hidrolítica 200 veces superior, y menor especificidad por  $\beta$ -1,3-glucanos. A pesar de estas diferencias, ambas moléculas poseen capacidad de unión a IgE de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo procedentes de Jaén, donde se ha demostrado que Ole e 9 es un alérgeno principal.

Para estudiar la posible reactividad cruzada entre Fra e 9 y Ole e 9 a nivel molecular se llevaron a cabo ensayos de inhibición en ELISA e inmunotinción utilizando los cuatro dominios recombinantes purificados (rNtD-Fra e 9, rNtD-Ole e 9, rCtD-Fra e 9 y rCtD-Ole e 9). La homología de secuencia entre las distintas moléculas se detalla en la tabla 11, donde se incluye Ole e 10, alérgeno homólogo a los dominios de unión a carbohidratos -CtD- de Fra e 9 y Ole e 9. La identidad de secuencia entre los rNtD de

Fra e 9 y Ole e 9 es relativamente baja (39%), mientras que, como ya se ha mencionado con anterioridad, los CtD tienen mayor identidad de secuencia entre sí (50%) y con Ole e 10 (52% con rCtD-Ole e 9 y 88% con rCtD-Fra e 9).

**TABLA 11. % de I y S entre Ole 9, Fra e 9 y Ole e 10.** En amarillo se indican los % de identidad y en verde los % de similitud. El guión (-) indica que no procede la comparación. Las secuencias comparadas de los dominios corresponden a las expresadas en cada caso.

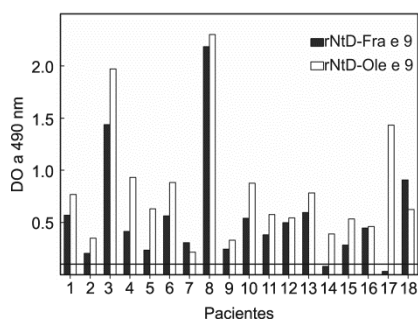
Alérgeno	Ole e 9	Fra e 9	rNtD Ole e 9	rNtD Fra e 9	rCtD Ole e 9	rCtD Fra e 9	Ole e 10
Ole e 9	100	41	-	-	-	-	-
Fra e 9	60	100	-	-	-	-	-
rNtD-Ole e 9	-	-	100	39	-	-	-
rNtD-Fra e 9	-	-	60	100	-	-	-
rCtD-Ole e 9	-	-	-	-	100	50	52
rCtD-Fra e 9	-	-	-	-	64	100	88
Ole e 10	-	-	-	-	68	89	100

La mayor identidad de secuencia de rCtD-Fra e 9 con Ole e 10 que con su equivalente en polen de olivo, rCtD-Ole e 9, hizo necesaria su inclusión en el estudio de reactividad cruzada. Los bajos porcentajes de similitud de secuencia entre los dominios N-terminal de las  $\beta$ -1,3-glucanasas obtenidas de los pólenes de fresno y olivo justifica las diferencias de título observadas para el pAb anti-rNtD-Fra e 9 (FIG. 58).

### 3.3.1. Estudio de la reactividad cruzada entre el dominio N-terminal de Fra e 9 y el de Ole e 9

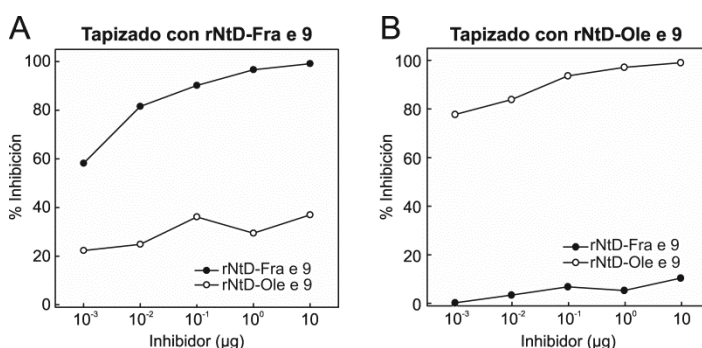
Se testaron en ELISA los dos dominios N-terminal con sueros de pacientes con respuesta IgE dirigida al dominio N-terminal de Ole e 9 (FIG. 62) -seleccionados por mostrar reconocimiento de este alérgeno en un testado previo en ELISA-. Ambos dominios mostraron un reconocimiento similar, a pesar de que en el 93.75% de los casos rNtD-Ole e 9 exhibe mayor capacidad de unión a IgE. Esto se puede explicar debido al criterio de selección de los sueros, procedentes de una población de pacientes de Jaén alérgicos al polen de olivo. Este resultado plantea la pregunta de si

ambas moléculas comparten preferentemente los epítomos reconocidos por las IgE o si por el contrario las IgE de los pacientes estarían reconociendo mayoritariamente epítomos distintos.



**FIGURA 62. Análisis mediante ELISA de la unión de las IgE del suero de pacientes alérgicos al polen de olivo.** La línea horizontal indica el límite de DO (0.1) por debajo del cual los valores se consideran negativos. Sueros utilizados a una dilución 1:10.

Para analizar la reactividad cruzada se reunieron 8 sueros (1, 3, 4, 10, 11, 12, 13 y 18) y se realizaron ensayos de inhibición en ELISA midiéndose la unión residual de las IgE de estos pacientes a rNtD-Fra e 9 y a rNtD-Ole e 9 utilizando como inhibidores ambas moléculas (FIG. 63).



**FIGURA 63. Ensayos de inhibición cruzada en ELISA realizados con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo.** Se tapizan 0.2 μg de rNtD-Fra e 9 y de rNtD-Ole e 9 y se inhibe con cantidades crecientes (1 ng-10 μg) de las mismas moléculas.

Las curvas obtenidas fueron comparables en ambos casos cuando se utilizó como inhibidor la molécula tapizada: siempre se alcanzó el 100% de inhibición, lo que indicó la presencia en el suero de los pacientes de IgE dirigidas a ambas moléculas, tal



y como se ilustraba en la figura 62. Sin embargo, se encontraron diferencias en cuanto a respuesta obtenida en las inhibiciones cruzadas en ambos casos. En el caso de la placa tapizada con rNtD-Fra e 9, se alcanzó un 37% de inhibición con su equivalente en polen de olivo (FIG. 63A), mientras que en la situación inversa, rNtD-Fra e 9 a penas fue capaz de alcanzar el 10% de inhibición de la unión de IgE a rNtD-Ole e 9 (FIG. 63B). Esta diferencia indicaría que los sueros de la población de pacientes estudiada tienen IgE dirigidas principalmente a epítomos presentes en el dominio N-terminal de Ole e 9, puesto que la inhibición alcanzada con esta molécula es mayor (FIG. 63A) a la obtenida en la inhibición inversa (FIG. 63B).

De los resultados mostrados en la figura 63 se deduce la existencia de determinantes antigénicos diferentes en los dominios N-terminales estudiados, frente a los que los pacientes alérgicos al polen de olivo presentan IgE. Esto se explicaría por el amplio número de isoformas contenidas en el polen de olivo -detectadas con el pAb anti-rNtD-Fra e 9 en la figura 60B- que serían susceptibles de ser alérgicas, no estando por tanto los pacientes sensibilizados a una sola de ellas. Por ello, el 88.9% de los sueros testados reconoce epítomos propios de rNtD-Fra e 9 sin ser el fresno una especie arbórea propia de la región donde residen estos pacientes.

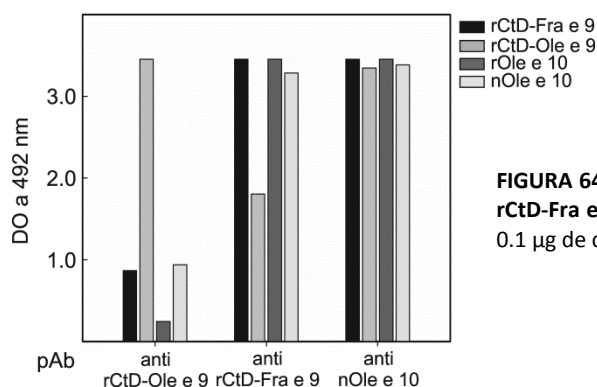
Hasta la fecha se disponía de los dos dominios recombinantes de la  $\beta$ -1,3-glucanasa del polen olivo, Ole e 9, así como de la molécula completa purificada de la fuente natural, pudiendo utilizarse estas herramientas en el diagnóstico *in vitro* de pacientes alérgicos. El poder disponer de una molécula, como rNtD-Fra e 9, que contenga epítomos representativos de otras isoformas de glucanasas presentes tanto en polen de fresno como de olivo, supone una herramienta adicional a las ya existentes para mejorar el diagnóstico de pacientes alérgicos, especialmente útil en aquellas poblaciones con elevada concentración de granos de polen de olivo en el ambiente, donde Ole e 9 es un alérgeno principal [Huecas y col., 2001; Barber y col., 2008].

La posible reactividad cruzada entre las moléculas de Fra e 9 y Ole e 9 no estaría principalmente mediada por los dominios N-terminales de estas proteínas, aunque éstos sí podrían desempeñar un papel en la reactividad cruzada con otras isoformas distintas de las caracterizadas, presentes en los pólenes de fresno y olivo, ya que son proteínas muy polimórficas.

### 3.3.2. Estudio de la reactividad cruzada entre los dominios C-terminal de Fra e 9 y de Ole e 9. Implicación del alérgeno Ole e 10

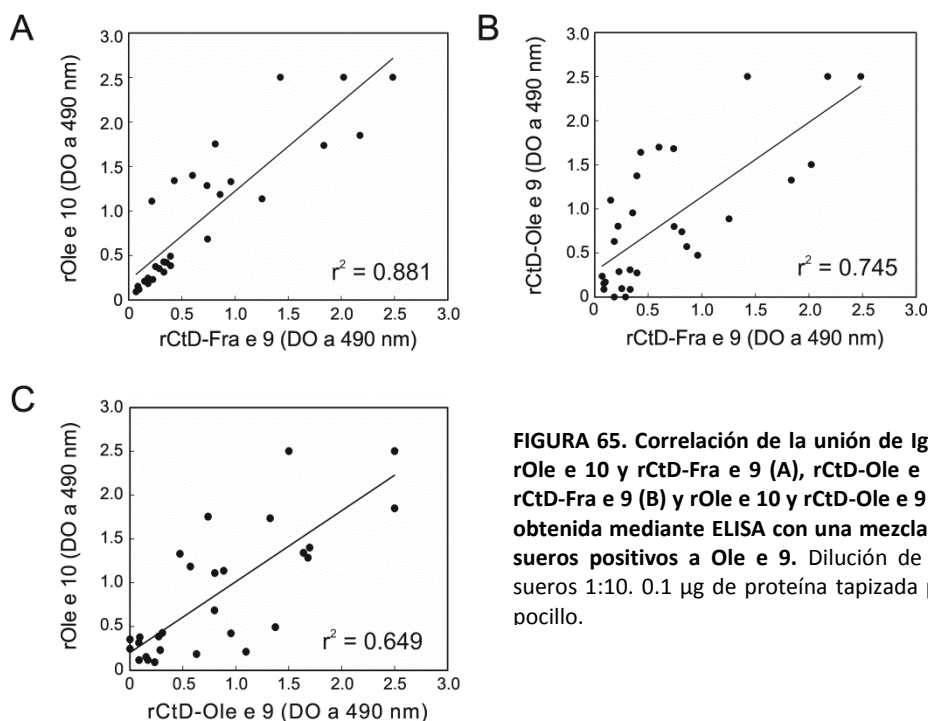
Los dominios C-terminales de Fra e 9 y Ole e 9, así como Ole e 10 son proteínas homólogas, siendo la estructura primaria de estas tres proteínas muy similar, especialmente entre rCtD-Fra e 9 y Ole e 10, que comparten un 88% de aminoácidos idénticos (TABLA 11), por ello se incluyó a Ole e 10 en los estudios de reactividad cruzada de los dominios CtD de las dos glucanasas.

Se testaron en ELISA las proteínas purificadas rCtD-Fra e 9, rCtD-Ole e 9, rOle e 10 y nOle e 10 con los pAbs específicos de cada uno de los CtD -Ole e 9 y Fra e 9- así como el específico de nOle e 10 (FIG. 64). La mayor similitud inmunológica la muestran rCtD-Fra e 9 y Ole e 10, mientras que con rCtD-Ole e 9 ambas proteínas comparten menos epítomos IgG.



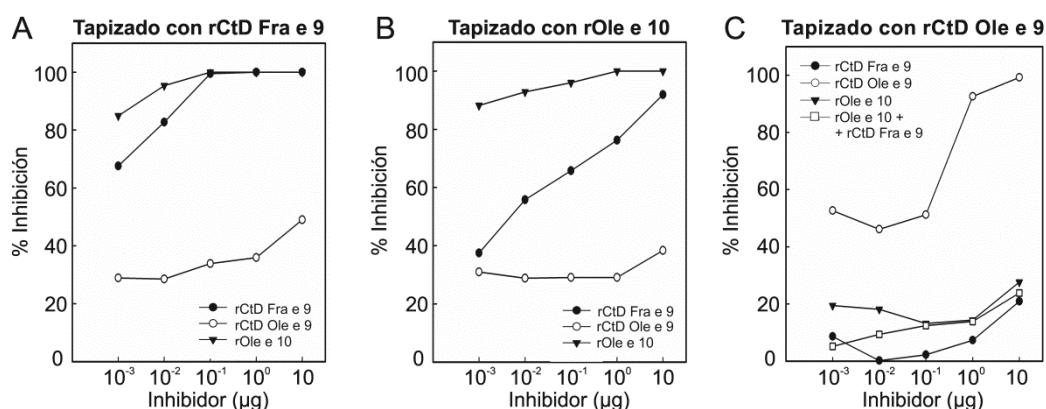
**FIGURA 64. Reconocimiento en ELISA de rCtD-Ole e 9, rCtD-Fra e 9, nOle e 10 y rOle e 10 con pAbs. Aplicado 0.1  $\mu$ g de cada proteína.**

Se testó con las tres proteínas recombinantes la respuesta IgE de sueros de pacientes de Jaén reactivos a Ole e 9 en ELISA, mostrando una correlación elevada en los tres casos (FIG. 65) -lo cual está de acuerdo con la gran identidad de secuencia que poseen-. El índice de correlación entre rOle e 10 y rCtD-Fra e 9 fue el mayor obtenido, con un valor de 0.881 (FIG. 65A), si bien se observó una tendencia hacia una mayor respuesta a rOle e 10 (22 sueros, 75.86% del total). Esta tendencia probablemente se deba a los diferentes residuos en la secuencia aminioacídica de las dos proteínas, y puesto que los sueros de pacientes de Jaén están sensibilizados a polen de olivo, reconocerán mejor a Ole e 10 que a CtD-Fra e 9. También podría influir el hecho de que la glicosilación presente en rCtD-Fra e 9 apantalle algún epítipo que por el contrario sí sería reconocido en rOle e 10 que no está glicosilada [Barral y col., 2005]. La correlación de la unión de IgE mostrada entre los rCtD fue de 0.745 (FIG. 65B) y la de rOle e 10 y rCtD-Ole e 9 de 0.649 (FIG. 65C), es decir, más baja que en el caso anterior, puesto que el porcentaje de identidad de secuencia existente entre estas proteínas es también inferior, del 48% y 52%, respectivamente.



**FIGURA 65.** Correlación de la unión de IgE a rOle e 10 y rCtD-Fra e 9 (A), rCtD-Ole e 9 y rCtD-Fra e 9 (B) y rOle e 10 y rCtD-Ole e 9 (C) obtenida mediante ELISA con una mezcla de sueros positivos a Ole e 9. Dilución de los sueros 1:10. 0.1  $\mu$ g de proteína tapizada por pocillo.

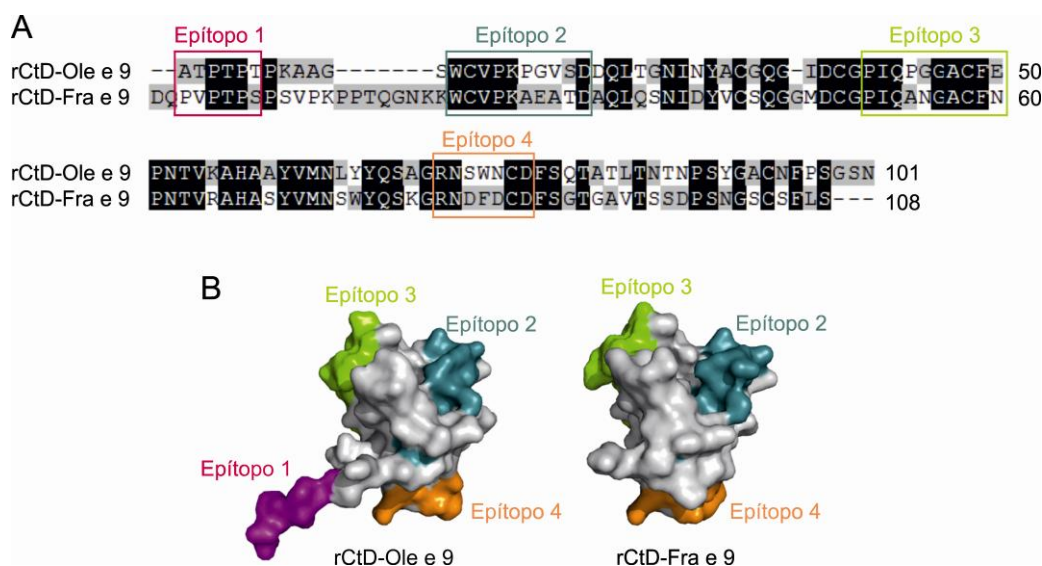
Estos datos se ven apoyados por los obtenidos de los ensayos de inhibición cruzada en ELISA realizados con las tres proteínas (FIG. 66), donde la inhibición alcanzada entre rOle e 10 y rCtD-Fra e 9 es al menos un 50% superior a la obtenida al utilizar rCtD-Ole e 9 como inhibidor para ambas moléculas (FIG. 66A y B). Esto apunta al hecho de que cambios puntuales de aminoácidos inducen una respuesta IgE diferente, o bien a la existencia de diferencias en el plegamiento de estas proteínas, puesto que a pesar de ser similares en cuanto a estructura primaria, y en consecuencia secundaria, hay diferencias en la unión de IgE. Al realizar una inhibición conjunta con rCtD-Fra e 9 y rOle e 10 de la unión de IgE a rCtD-Ole e 9 se alcanzó un porcentaje muy similar al obtenido con cada uno de las dos moléculas, rCtD-Fra e 9 y rOle e 10, por separado (FIG. 66C). Esto indica por tanto, que rCtD-Fra e 9 y rOle e 10 comparten mayor número de epítomos IgE entre sí que con rCtD-Ole e 9. En vista de los resultados obtenidos, Ole e 10 sería candidato a participar en la reactividad cruzada entre los pólenes de fresno y olivo mediada por  $\beta$ -1,3-glucanasas.



**FIGURA 66. Ensayos de inhibición cruzada en ELISA realizados con una mezcla de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. A, Se tapizaron 0.1 μg de rCtD-Fra e 9, B, de rOle e 10 y C, de rCtD-Ole e 9, inhibiendo con cantidades crecientes de los alérgenos de hasta un total de 10 μg.**

Si comparamos los 4 epítomos IgE secuenciales descritos en rCtD-Ole e 9 [Treviño y col., 2008] con la secuencia correspondiente a estas mismas regiones en

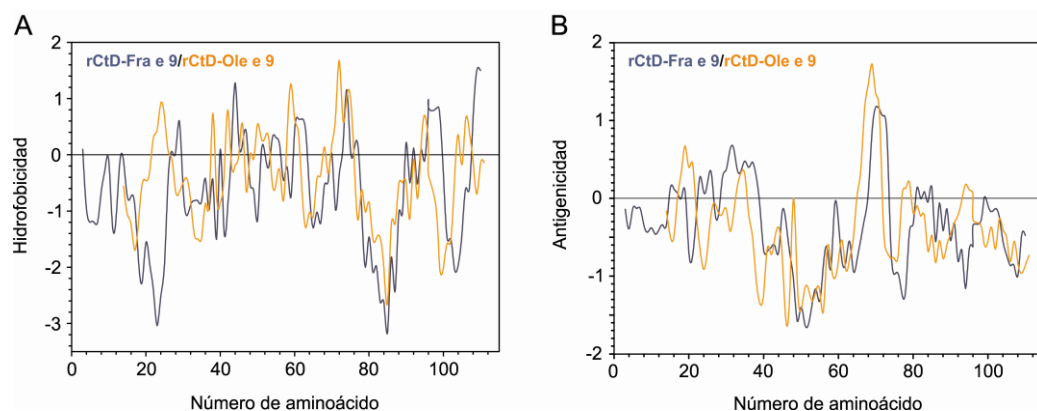
rCtD-Fra e 9 (FIG. 67B), vemos que el epítipo 1, a pesar de no modelarse en rCtD-Fra e 9 (aminoácidos 3-8) (FIG. 67C), está potencialmente accesible, aunque con una probabilidad menor que en rCtD-Ole e 9 (FIG. 67A). Los epítipos 2 (aminoácidos 23-32) y 3 (aminoácidos 51-60) muestran probabilidades similares de encontrarse accesibles, mientras que el epítipo 4 en rCtD-Ole e 9 está parcialmente accesible y en rCtD-Fra e 9 (aminoácidos 81-87) no lo está (FIG. 67C). Estas diferencias en la accesibilidad de las regiones antigénicas entre los dos dominios C-terminales estarían apoyando el hecho de que en las inhibiciones cruzadas de unión a IgE entre ambos no se alcance el 100% (FIG. 66A y C).



**FIGURA 67. Localización en la estructura de rCtD-Fra e 9 de los epítipos secuenciales IgE descritos en rCtD-Ole e 9. A,** Alineamiento de secuencia aminoacídica de rCtD-Ole e 9 y rCtD-Fra e 9. Se indican en ambas moléculas los epítipos de rCtD-Ole e 9. **C,** Representación 3D de rCtD-Ole e 9 (PDB 2JON) y de rCtD-Fra e 9 (modelado a partir de rCtD-Ole e 9). Se indican en ambas moléculas los epítipos IgE de rCtD-Ole e 9.

A partir de la secuencia de aminoácidos de rCtD-Fra e 9 se han obtenido los perfiles de hidrofobicidad y antigenicidad según el modelo descrito por Kyte y

Doolittle [Kyte y col., 1982] y Welling y col. [Welling y col., 1985], respectivamente (FIG. 68) y se han comparado con los obtenidos para rCtD-Ole e 9.



**FIGURA 68. Hidrofobicidad de rCtD-Fra e 9 y rCtD-Ole e 9. A,** representación de las predicciones teóricas de hidrofobicidad -Kyte y Doolittle- y **B,** antigenicidad -Welling y col.- sobre las secuencias de rCtD-Fra e 9 y rCtD-Ole e 9. Azul, perfiles de rCtD-Fra e 9. Naranja, perfiles de rCtD-Ole e 9.

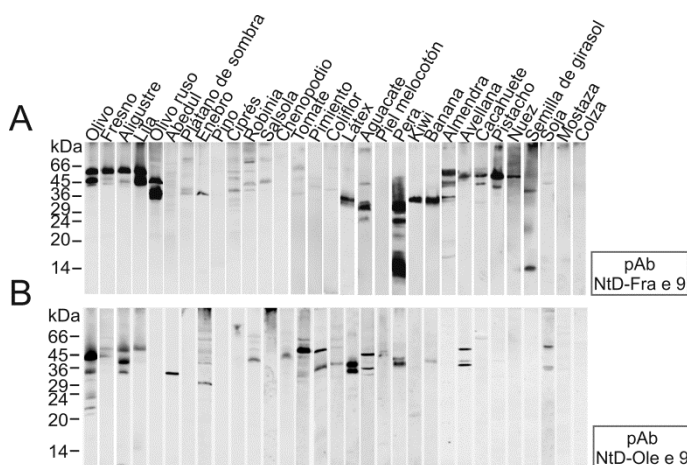
Los perfiles tanto de hidrofobicidad como de antigenicidad de ambos dominios son muy similares, concentrándose las diferencias más significativas en los primeros (22-25) y últimos (104-107) residuos aminoacídicos. Respecto al perfil de antigenicidad, se observan en rCtD-Fra e 9 tres posibles epítomos comprendidos entre los aminoácidos: 15-19, 29-38 y 68-73; y un cuarto menos probable comprendiendo los aminoácidos 81-85. Los tres epítomos principales solapan con regiones potencialmente antigénicas de rCtD-Ole e 9 y son regiones principalmente hidrofílicas y por tanto expuestas en la superficie de la molécula plegada.

#### **4. REACTIVIDAD CRUZADA DE Fra e 9 Y Ole e 9 CON $\beta$ -1,3-GLUCANASAS PRESENTES EN EXTRACTOS PROTEICOS DE PÓLENES Y ALIMENTOS VEGETALES**

Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son enzimas características de plantas, algunas de las cuales han sido descritas como alérgicas susceptibles de participar en procesos de reactividad cruzada [Yagami y col., 2002; Wagner y col., 2004; Palomares y col., 2005; Barre y col., 2009]. Se trata de moléculas útiles en el diagnóstico, ya que pueden ayudar en la identificación de pacientes con riesgo de desarrollar una sintomatología alérgica a frutas, vegetales, látex y polen. De hecho, se ha sugerido la implicación tanto de Hev b 2 -de látex- [Barre y col., 2009] como del dominio N-terminal de Ole e 9 -del polen de olivo- [Palomares y col., 2005] en reactividad cruzada a nivel de IgE entre diferentes fuentes alérgicas de origen vegetal, incluyendo pólenes en el caso de Ole e 9.

##### **4.1. Epítomos IgG comunes a Fra e 9 y Ole e 9 en otras glucanasas de origen vegetal**

Con el objetivo de detectar  $\beta$ -1,3-glucanasas con epítomos IgG comunes a Fra e 9 y a Ole e 9, se testaron los anticuerpos policlonales producidos frente a los dominios recombinantes N-terminal y C-terminal de ambas moléculas, con diferentes extractos proteicos de pólenes, alimentos vegetales -frutas, verduras, hortalizas y frutos secos- y látex. En ambos casos se reconocieron bandas entre 45 kDa y 35 kDa en diversos extractos (FIG. 69 y 70).

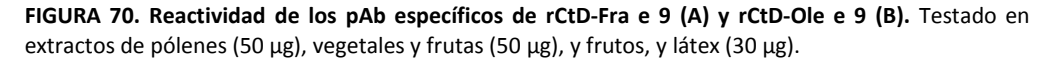


**FIGURA 69. Reactividad de los pAbs específicos frente al dominio rNtD-Fra e 9 (A) y rNtD-Ole e 9 (B).** Testado en extractos de pólenes (50 µg), vegetales y frutas (50 µg), y frutos secos y látex (30 µg).

Frutos secos como almendra, cacahuete, nuez o pistacho, contienen glucanasas de larga cadena polipeptítica ( $\geq 45$  kDa) que son reconocidas por el anticuerpo policlonal específico frente a rNtD-Fra e 9 (FIG. 69). Sin embargo, el reconocimiento por parte del anticuerpo policlonal específico de rNtD-Ole e 9 está dirigido principalmente a frutas y hortalizas, no reconociendo bandas en frutos secos y semillas salvo en avellana y soja. Respecto a los pólenes, se detectan en Oleáceas más glucanasas homólogas a Fra e 9 que a Ole e 9 a través de sus dominios N-terminales. En otros pólenes el reconocimiento con ambos anticuerpos es escaso.

El polen de fresno y olivo muestran un reconocimiento similar por parte del pAb anti-rCtD-Fra e 9, el cual también reconoce, además de en las Oleáceas testadas, una banda en otros pólenes como el de ciprés y salsola, así como en diversos alimentos vegetales como aguacate, almendra, avellana y colza (FIG. 70A), todas ellas correspondientes a proteínas de entre 45-50 kDa -  $\beta$ -1,3-glucanasas largas- salvo en ciprés donde la banda detectada tiene una masa molecular aparente que no correspondería con una  $\beta$ -1,3-glucanasa con dominio de unión a carbohidratos. Con el pAb anti-rCtD-Ole e 9 también hay un buen reconocimiento en los extractos de Oleáceas, siendo el fresno el que presenta mayores diferencias. El pAb anti-rCtD-Fra e 9 es capaz de detectar bandas a la altura de aproximadamente 45 kDa en la mayoría

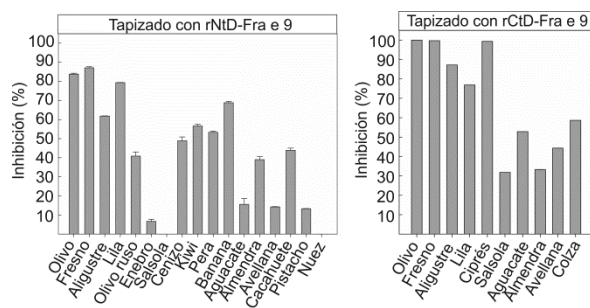




#### 4.2. Epítomos IgE comunes a Fra e 9 y Ole e 9 en otras glucanasas de origen vegetal

167

Los miembros de la familia de las Oleáceas fueron los que mostraron porcentajes de inhibición más elevados (62%-87% para rNtD-Fra e 9 y 77%-100% para rCtD-Fra e 9) junto con el polen de cenizo para el rNtD-Fra e 9 (49%), y el de ciprés para rCtD-Fra e 9 (99.4%). Determinados vegetales alcanzaron valores de inhibición elevados, 56.7% para el kiwi, 53.3% para la pera y 68.8% banana en el caso de rNtD-Fra e 9, mientras que los frutos secos y semillas alcanzaron valores de inhibición más elevados en la placa tapizada con rCtD-Fra e 9, salvo en el caso de la almendra, donde la inhibición obtenida es similar para ambos dominios (un 5% superior en la placa tapizada con rNtD-Fra e 9).



**FIGURA 71. ELISA de inhibición de unión a IgE a rNtD-Fra e 9 y rCtD-Fra e 9.** Como inhibidores se utilizan diferentes extractos (500 µg) y la mezcla de sueros se utilizó a una dilución 1:10.

Aquellos extractos que presentan inhibición contendrían roteínas homólogas a Fra e 9. Para caracterizar la similitud inmunológica y/o estructural de esas proteínas se precisaría realizar un estudio más detallado utilizando dichas proteínas purificadas.

## SEGUNDA PARTE: DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio se ha identificado y caracterizado una  $\beta$ -1,3-glucanasa alérgica en polen de fresno (*Fraxinus excelsior*). Se trata de una enzima perteneciente a la familia de glicosil-hidrolasas 17 (GHF 17) de plantas superiores, incluidas en la familia de proteínas de defensa PR-2 [Linthorst y col., 1990]. Estas proteínas son susceptibles de ser inducidas en respuesta a la agresión de un patógeno. Sin embargo también pueden expresarse en la planta de manera constitutiva, y desempeñar un papel en la remodelación de la pared celular durante el desarrollo de la planta o en procesos reproductivos de la misma [Parre y col., 2005; Wan y col., 2011]. Proteínas como xilanasas y pectin metilesterasas, también implicadas en el metabolismo de carbohidratos durante el proceso de germinación del polen, juegan un papel importante en la interacción entre polen y pistilo durante la reproducción de la planta. Por otro lado, algunas de ellas han sido catalogadas como aeroalérgenos [Barderas y col., 2007; Sotkovsky y col., 2011], habiéndose identificado también en la familia de las Oleáceas a Ole e 9 -  $\beta$ -1,3-glucanasa - y a Ole Ole e 11 -pectin metilesterasa- [Huecas y col., 2001; Salamanca y col., 2010], ambas alérgenos relevantes en polen de olivo.

La actividad alérgica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas como alérgenos ha sido, en general, poco estudiada y se carece de una detallada caracterización estructural y bioquímica de las mismas. De las pocas descritas como alérgicas, sólo Hev b 2 de látex [Alenius y col., 1995], Mus a 5 de banana [Peumans y col., 2000] y Ole e 9 de polen de olivo [Huecas y col., 2001] han sido estudiadas en mayor profundidad, a pesar de que se trata de enzimas que han sido detectadas en diversas fuentes alérgicas [Palomares y col., 2005]. El hecho de que las  $\beta$ -1,3-glucanasas se encuentren ampliamente distribuidas en plantas superiores, siendo algunas de ellas alérgicas, les confiere un gran interés como objeto de estudio de los procesos alérgicos.

La posible relevancia clínica de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de polen de fresno se ve incrementada por el hecho de que i) la familia de las Oleáceas es una importante fuente alergénica, dentro de la cual Ole e 9 está considerado como un alérgeno mayoritario en ciertas regiones del sur de España, ii) la polinosis a fresno es importante en muchos países europeos, y iii) se ha asociado reactividad cruzada a muchos alérgenos entre los pólenes de Oleáceas [Rodríguez y col., 2001; Batanero y col., 2010; Villalba y col., 2013].

La purificación de alérgenos directamente de la fuente biológica puede ser una tarea complicada, debido principalmente a la baja concentración de los mismos y la frecuente existencia de un elevado número de isoformas. En el caso de las  $\beta$ -1,3-glucanasas de polen de fresno no resultó posible realizar una preparación homogénea de las mismas por su escasa presencia en el polen, por lo que se optó por una aproximación recombinante para la obtención de la proteína pura. La producción de Fra e 9 recombinante trató de realizarse en la levadura *P. pastoris* sin resultado alguno, por lo que se optó por expresar los dos dominios de la molécula por separado.

Fra e 9 es una  $\beta$ -1,3-glucanasa larga (461 aminoácidos) y básica (pI 8.52) que presenta características moleculares y funcionales diferenciadoras respecto de Ole e 9 [Huecas y col., 2001]. La proteína madura tiene una masa molecular de 46962.3 Da y está estructurada en dos dominios funcionalmente activos -un dominio N-terminal catalítico y un dominio de unión a carbohidratos en el C-terminal-, conectados por un segmento rico en prolinas.

Desde el punto de vista funcional, el análisis comparativo entre Ole e 9 y Fra e 9 llevado a cabo con cada uno de los dominios revela diferencias notables entre ambas moléculas. La capacidad de rNtD-Fra e 9 (pI 9.05) para hidrolizar  $\beta$ -1,3-glucanos -como la laminarina- es 200 veces superior a la de este dominio en Ole e 9 (pI 5.51). Estas particularidades concuerdan con los datos recogidos en la bibliografía que atribuyen a las  $\beta$ -1,3-glucanasas básicas mayor actividad hidrolítica [Schenk y col., 1995]. El dominio C-terminal de unión a carbohidratos, definido dentro de la familia CBM43

[Barral y col., 2005], conserva los seis residuos de cisteína característicos, así como los triptófanos y tirosinas, implicados estos últimos en la interacción con los anillos del azúcar del ligando [Guillén y col., 2010]. rCtD-Fra e 9 es capaz de unir laminarina  $\beta$ -1,3-glucano-, con menor afinidad que rCtD-Ole e 9, y otros carbohidratos de elevada longitud con enlace  $\beta$ -1,3;1,4 como el lichenan. El comportamiento, en cuanto a la unión de carbohidratos de rCtD-Fra e 9, se asemeja más al del alérgeno Ole e 10, ambas moléculas con una elevada similitud de secuencia (88%). La menor capacidad de unión de rCtD-Fra e 9 podría verse compensada por la mayor actividad enzimática del dominio catalítico. Este dominio C-terminal rico en cisteínas podría estar implicado en la regulación de la actividad catalítica uniendo polisacáridos y acercándolos a las proximidades del sitio catalítico facilitando la hidrólisis del sustrato [Guillén y col., 2010].

Se ha descrito reactividad cruzada en pacientes alérgicos a Oleáceas -olivo, fresno, aligustre y lila-, siendo las fuentes alérgicas más importantes el olivo y el fresno. El fresno está ampliamente distribuido en Europa de Norte y Europa Central, mientras que el olivo se concentra principalmente en el área mediterránea. En general, se ha observado una elevada similitud de secuencia entre proteínas homólogas dentro de la familia *Oleaceae*, por ejemplo Ole e 1 exhibe más de un 85% de identidad de secuencia aminoacídica con sus semejantes en polen de fresno -Fra e 1-, de aligustre -Lig v 1- y de lila -Syr v 1- [Rodríguez y col., 2007]. Sin embargo, Fra e 9 y Ole e 9 presentan tan solo una identidad de secuencia del 40%, mientras que la identidad de Fra e 9 con otras  $\beta$ -1,3-glucanasas, como la de pera, es significativamente mayor (56%). Al analizar la reactividad cruzada entre glucanasas contenidas en los extractos proteicos de polen de olivo y de fresno se detectaron en ambos pólenes  $\beta$ -1,3-glucanasas capaces de inhibir la unión de IgE a los dominios de Fra e 9 y Ole e 9. Sin embargo, el análisis de los dominios recombinantes de ambas proteínas apuntó la existencia de epítomos IgE diferentes entre los dos dominios N-terminales. Mientras que en el caso del dominio C-terminal de Fra e 9, éste compartiría la mayor parte de epítomos tanto con el CtD de Ole e 9 como con Ole e 10, siendo algunos de ellos

complementarios, puesto que la suma de rCtD-Fra e 9 y Ole e 10 supone la inhibición total de la unión de IgE a rCtD-Ole e 9.

En cuanto a la relación estructural de los dominios de Fra e 9 y Ole e 9 con glucanasas de otras fuentes vegetales, hay diferencias respecto al reconocimiento de las IgG de los anticuerpos policlonales específicos tanto de los dominios N-terminales entre sí como de los C-terminales. En frutos secos prevalecen las  $\beta$ -1,3-glucanasas similares a Fra e 9, mientras que en pólenes son mayoritarias las homólogas al CtD de Ole e 9. Dentro de las cuatro Oleáceas testadas -olivo, fresno, aligustre y lila- se detectan isoformas homólogas a Fra e 9 en todas ellas, mientras que Ole e 9 resulta ser una molécula menos conservada en estos pólenes. Los ensayos de inhibición de la unión de IgE a los dominios de Fra e 9 empleando distintos extractos revelan la presencia de glucanasas que comparten epítomos IgE con Fra e 9. Estos datos contrastan con los realizados con rNtD-Ole e 9, donde la reactividad cruzada con los alimentos testados está principalmente dirigida a tomate, pimiento y patata [Palomares y col., 2005], mientras que en el caso de Fra e 9 éstos no muestran reactividad, siendo los de banana, kiwi y pera los que experimentalmente parecen compartir más epítomos IgE.

Fra e 9 es la segunda  $\beta$ -1,3-glucanasa estudiada en la familia de las Oleáceas. A diferencia de Ole e 9 -proteína ácida, con escasa actividad bioquímica y elevada afinidad por laminarina- Fra e 9 presenta características tanto moleculares como enzimáticas diferentes a su homóloga en polen de olivo, pero sin embargo ambas moléculas resultan ser reconocidas por IgE de sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo. A pesar de que no se han encontrado sueros de pacientes alérgicos al polen de fresno que reconozcan a los dominios recombinantes de Fra e 9 (datos no mostrados correspondientes a 25 sueros ensayados en ELISA), los dominios recombinantes expresados de esta molécula son reconocidos por pacientes alérgicos al polen de olivo y contienen además epítomos IgE no presentes en Ole e 9. rNtD y rCtD de Fra e 9 son por tanto proteínas susceptibles de ser alergénicas y que podrían

resultar de utilidad en el diagnóstico de pacientes alérgicos al polen de fresno. En el caso de pacientes alérgicos al polen de olivo, rNtD-Fra e 9, al contener epítomos IgE que no están presentes en rNtD-Ole e 9 pero que sin embargo son reconocidos por determinados pacientes con polinosis a olivo, sería una molécula útil para un mejor diagnóstico de estos pacientes.





**CONCLUSIONES**  
**GENERALES**  
**General conclusions**



---

## CONCLUSIONES GENERALES/General conclusions

---

In the present work, we have studied in detail the structural and functional properties of allergenic members from two well-recognized allergenic protein families belonging to the pathogenesis-related (PR) protein superfamily, TLPs (PR-5) and  $\beta$ -1,3-glucanases (PR-2). Our results provide novel insight into the structural and functional features of these two protein families and contribute to enhance the knowledge about their role in the context of allergic diseases.

The main conclusions derived from this work are:

- 1- The thaumatin-like protein Ole e 13, the single allergen identified so far in olive fruit, is fully degraded in processed olives after maceration of the olive fruit, which leads to the loose of the IgE epitopes.
- 2- Ole e 13 has been produced as a recombinant protein in the yeast *P. pastoris*. A molecular and immunological characterization of the purified protein demonstrated that the recombinant allergen conserves its properties unaltered in comparison with the natural Ole e 13. rOle e 13 also shows similar structural features to other described TLPs.
- 3- A new ash pollen allergen, Fra e 9, has been sequenced and cloned. Fra e 9 is a basic glycoprotein (pI 8.52) consisting of a single polypeptide chain with a molecular weight of (46948.3 Da). Fra e 9 shows high percentage of sequence identity with  $\beta$ -1,3-glucanases from different species such as potato (64%), grape (60%) or pear (59%), which are significantly higher than those observed with olive pollen (40%). Fra e 9 shows high polymorphism, with a wider spectrum of basic isoforms than Ole e 9.

- 4- The N- and C-terminal domains of Fra e 9 (rNtD-Fra e 9 and rCtD-Fra e 9) have been produced as well-defined recombinant proteins in *E. coli* and *P. pastoris*, respectively.
- 5- The rNtD-Fra e 9 displays 200-fold higher in vitro hydrolytic activity on laminarin than rNtD-Ole e 9 but it shows no antifungal capacity when assayed with the several fungi species (*F. oxysporum*, *A. niger*, *A. ochraceus* and *A. flavus*).
- 6- The rCtD-Fra e 9 is able to bind the  $\beta$ -1,3-glucan laminarin but it displays less affinity than rCtD-Ole e 9 and Ole e 10. In addition, rCtD-Fra e 9 is able to bind long chain  $\beta$ -1,3;1,4 glucans such as lichenan.
- 7- The IgE binding capacity of both recombinant domains of Fra e 9 has been demonstrated and it is equivalent to that observed for their homologous counterparts from Ole e 9.
- 8-  $\beta$ -1,3-glucanases from ash and olive pollen extracts share IgE epitopes. Fra e 9 and Ole e 9 retain comparable IgE-binding capacity when assayed with sera from olive pollen allergic patients.
- 9- rNtD-Fra e 9 contains IgE epitopes not present in rNtD-Ole e 9 but recognized by olive pollen allergic patients, which could be also useful to improve the diagnosis of these patients.
- 10- Besides Oleaceae family, there have been detected homologue proteins to both Fra e 9 domains in several pollen (*Cupressus*, *Salsola* and *Chenopodium*) and vegetable food sources (nuts, banana, kiwi pear and avocado).

# **BIBLIOGRAFÍA**

## **Bibliography**



## BIBLIOGRAFÍA/Bibliography

- Abad, L. R., D'Urzo, M. P., Liu, D., Narasimhan, M. L., Reuveni, M., Zhu, J. K., y col. (1996). "Antifungal activity of tobacco osmatin has specificity and involves plasma membrane permeabilization." *Plant Science* **118** 13.
- Akkoc, T., Akdis, M. y Akdis, C. A. (2011). "Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Allergy Asthma Immunol Res* **3** 11-20.
- Akkoc, T., de Koning, P. J., Ruckert, B., Barlan, I., Akdis, M. y Akdis, C. A. (2008). "Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases." *J Allergy Clin Immunol* **121** 652-658 e651.
- Al-Niaimi, F., Chiang, Y. Z., Chiang, Y. N. y Williams, J. (2013). "Latex allergy: assessment of knowledge, appropriate use of gloves and prevention practice among hospital healthcare workers." *Clin Exp Dermatol* **38** 77-80.
- Alenius, H., Kalkkinen, N., Lukka, M., Reunala, T., Turjanmaa, K., Makinen-Kiljunen, S., y col. (1995). "Prohevein from the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is a major latex allergen." *Clin Exp Allergy* **25** 659-665.
- Altmann, F. (2007). "The role of protein glycosylation in allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **142** 99-115.
- Álvarez-Eire, M. G., Pineda de la Losa, F., Varela Losada, S., González de la Cuesta, C. y Ricardo Palacios, R. (2012). "Anaphylaxis to olive fruit due to lipoprotein sensitization." *Allergol Immunopathol (Madr)* **40** 198-200.
- Aranda, A., Campo, P., Palacín, A., Dona, I., Gómez-Casado, C., Galindo, L., y col. (2013). "Antigenic proteins involved in occupational rhinitis and asthma caused by obeche wood (*Triplochiton scleroxylon*)." *PLoS One* **8** e53926.
- Arruda, L. K., Ferriani, V. P., Vailles, L. D., Pomes, A. y Chapman, M. D. (2001). "Cockroach allergens: environmental distribution and relationship to disease." *Curr Allergy Asthma Rep* **1** 466-473.

- Asturias, J. A. (2009). "Recombinant hypoallergens for immunotherapy of *Parietaria judaica* pollen allergy." *Front Biosci (Landmark Ed)* **14** 4606-4617.
- Azofra, J. (2004). "Olive allergy." *Allergy* **59** 559.
- Barber, D., de la Torre, F., Feo, F., Florido, F., Guardia, P., Moreno, C., y col. (2008). "Understanding patient sensitization profiles in complex pollen areas: a molecular epidemiological study." *Allergy* **63** 1550-1558.
- Barber, D., de la Torre, F., Lombardero, M., Antepara, I., Colas, C., Dávila, I., y col. (2009). "Component-resolved diagnosis of pollen allergy based on skin testing with profilin, polcalcin and lipid transfer protein pan-allergens." *Clin Exp Allergy* **39** 1764-1773.
- Barber, D., Moreno, C., Ledesma, A., Serrano, P., Galan, A., Villalba, M., y col. (2007). "Degree of olive pollen exposure and sensitization patterns. Clinical implications." *J Investig Allergol Clin Immunol* **17 Suppl 1** 11-16.
- Barderas, R., García-Sellés, J., Salamanca, G., Colás, C., Barber, D., Rodríguez, R. y Villalba, M. (2007). "A pectin methylesterase as an allergenic marker for the sensitization to Russian thistle (*Salsola kali*) pollen." *Clin Exp Allergy* **37** 1111-1119.
- Barderas, R., Purohit, A., Papanikolaou, I., Rodríguez, R., Pauli, G. y Villalba, M. (2005). "Cloning, expression, and clinical significance of the major allergen from ash pollen, Fra e 1." *J Allergy Clin Immunol* **115** 351-357.
- Barderas, R., Villalba, M., Lombardero, M. y Rodríguez, R. (2002). "Identification and characterization of Che a 1 allergen from *Chenopodium album* pollen." *Int Arch Allergy Immunol* **127** 47-54.
- Barderas, R., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2004). "Recombinant expression, purification and cross-reactivity of chenopod profilin: rChe a 2 as a good marker for profilin sensitization." *Biol Chem* **385** 731-737.
- Barral, P. (2005). Ole e 10, alergeno del polen de olivo, define una nueva familia de proteínas ligantes de carbohidratos: relevancia clínica y bioquímica. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.



- Barral, P., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2004). "A major allergen from pollen defines a novel family of plant proteins and shows intra- and interspecies cross-reactivity." *J Immunol* **172** 3644-3651.
- Barral, P., Batanero, E., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2005). "Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: evidence of post-translational modifications." *Protein Expr Purif* **44** 147-154.
- Barral, P., Suárez, C., Batanero, E., Alfonso, C., Alche Jde, D., Rodríguez-García, M. I., y col. (2005). "An olive pollen protein with allergenic activity, Ole e 10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination." *Biochem J* **390** 77-84.
- Barral, P., Villalba, M., Rodríguez, R. y Batanero, E. (2006). "The role of major olive pollen allergens Ole e 1, Ole e 9, and Ole e 10 on mice sensitization." *Ann Allergy Asthma Immunol* **96** 466-471.
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W. J., Van Damme, E. J., y col. (2009). "Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3- $\beta$ -glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome." *Mol Immunol* **46** 1595-1604.
- Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Selman, L., Peumans, W. J., Van Damme, E. J., y col. (2009). "Mapping of IgE-binding epitopes on the major latex allergen Hev b 2 and the cross-reacting 1,3 $\beta$ -glucanase fruit allergens as a molecular basis for the latex-fruit syndrome." *Mol Immunol* **46** 1595-1604.
- Barre, A., Peumans, W. J., Menu-Bouaouiche, L., Van Damme, E. J., May, G. D., Herrera, A. F., y col. (2000). "Purification and structural analysis of an abundant thaumatin-like protein from ripe banana fruit." *Planta* **211** 791-799.
- Bartra, J., Mullol, J., del Cuvillo, A., Davila, I., Ferrer, M., Jauregui, I., y col. (2007). "Air pollution and allergens." *J Investig Allergol Clin Immunol* **17 Suppl 2** 3-8.
- Batalia, M. A., Monzingo, A. F., Ernst, S., Roberts, W. y Robertus, J. D. (1996). "The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family." *Nat Struct Biol* **3** 19-23.

- Batanero, E., Rodríguez, R. y Villalba, M., Eds. (2010). Olive Pollen Allergens: an insight into clinical, diagnostic and therapeutic concepts of allergy. Olives and olive oil in health and disease prevention, Academic Press.
- Batanero, E., Villalba, M., Ledesma, A., Puente, X. S. y Rodríguez, R. (1996). "Ole e 3, an olive-tree allergen, belongs to a widespread family of pollen proteins." *Eur J Biochem* **241** 772-778.
- Bauer, A. (2013). "Contact dermatitis in the cleaning industry." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **13** 521-524.
- Bessot, J. C. y Pauli, G. (2011). "Mite allergens: an overview." *Eur Ann Allergy Clin Immunol* **43** 141-156.
- Blake, A. W., McCartney, L., Flint, J. E., Bolam, D. N., Boraston, A. B., Gilbert, H. J. y Knox, J. P. (2006). "Understanding the biological rationale for the diversity of cellulose-directed carbohydrate-binding modules in prokaryotic enzymes." *J Biol Chem* **281** 29321-29329.
- Bleumink, E. y Young, E. (1969). "Studies on the atopic allergen in hen's egg. I. Identification of the skin reactive fraction in egg-white." *Int Arch Allergy Appl Immunol* **35** 1-19.
- Bolam, D. N., Xie, H., Pell, G., Hogg, D., Galbraith, G., Henrissat, B. y Gilbert, H. J. (2004). "X4 modules represent a new family of carbohydrate-binding modules that display novel properties." *J Biol Chem* **279** 22953-22963.
- Boulay, A., Houghton, J., Gancheva, V., Sterk, Y., Strada, A., Schlegel-Zawadzka, M., y col. (2008). "A EuroPrevall review of factors affecting incidence of peanut allergy: priorities for research and policy." *Allergy* **63** 797-809.
- Bousquet, J., Anto, J., Auffray, C., Akdis, M., Cambon-Thomsen, A., Keil, T., y col. (2011). "MeDALL (Mechanisms of the Development of ALLergy): an integrated approach from phenotypes to systems medicine." *Allergy* **66** 596-604.
- Bublin, M., Radauer, C., Knulst, A., Wagner, S., Scheiner, O., Mackie, A. R., y col. (2008). "Effects of gastrointestinal digestion and heating on the allergenicity of the kiwi allergens Act d 1, actinidin, and Act d 2, a thaumatin-like protein." *Mol Nutr Food Res* **52** 1130-1139.

- Bucciaglia, P. A. y Smith, A. G. (1994). "Cloning and characterization of Tag 1, a tobacco anther  $\beta$ -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution." *Plant Mol Biol* **24** 903-914.
- Bulcke, M. V., Bauw, G., Castresana, C., Van Montagu, M. y Vandekerckhove, J. (1989). "Characterization of vacuolar and extracellular beta(1,3)-glucanases of tobacco: Evidence for a strictly compartmentalized plant defense system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86** 2673-2677.
- Burks, A. W., Calderon, M. A., Casale, T., Cox, L., Demoly, P., Jutel, M., y col. (2013). "Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report." *J Allergy Clin Immunol* **131** 1288-1296 e1283.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Connaughton, C., Cockrell, G., O'Brien, T. J. y Helm, R. M. (1992). "Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive peanut challenge." *J Allergy Clin Immunol* **90** 962-969.
- Burks, A. W., Williams, L. W., Helm, R. M., Connaughton, C., Cockrell, G. y O'Brien, T. (1991). "Identification of a major peanut allergen, Ara h I, in patients with atopic dermatitis and positive peanut challenges." *J Allergy Clin Immunol* **88** 172-179.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B. (2009). "The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics." *Nucleic Acids Res* **37** D233-238.
- Cárdaba, B., De Pablo, R., Vilches, C., Martín, E., Geller-Bernstein, C., De Andres, B., y col. (1996). "Allergy to olive pollen: T-cell response from olive allergic patients is restricted by DR7-DQ2 antigens." *Clin Exp Allergy* **26** 316-322.
- Casacuberta, J. M., Raventos, D., Puigdomenech, P. y San Segundo, B. (1992). "Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos." *Mol Gen Genet* **234** 97-104.
- Castro, A. J., Alche, J. D., Calabozo, B., Rodríguez-García, M. I. y Polo, F. (2007). "Pla I 1 and Ole e 1 pollen allergens share common epitopes and similar ultrastructural localization." *J Investig Allergol Clin Immunol* **17 Suppl 1** 41-47.

- Commins, S. P. y Platts-Mills, T. A. (2010). "Allergenicity of carbohydrates and their role in anaphylactic events." *Curr Allergy Asthma Rep* **10** 29-33.
- Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A., Lopez, E., Lombardero, M., y col. (2004). "Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment." *Allergy* **59** 485-490.
- Cox, L. y Jacobsen, L. (2009). "Comparison of allergen immunotherapy practice patterns in the United States and Europe." *Ann Allergy Asthma Immunol* **103** 451-459; quiz 459-461, 495.
- Cox, L., Larenas-Linnemann, D., Lockey, R. F. y Passalacqua, G. (2010). "Speaking the same language: The World Allergy Organization Subcutaneous Immunotherapy Systemic Reaction Grading System." *J Allergy Clin Immunol* **125** 569-574, 574 e561-574 e567.
- Cox, L., Nelson, H., Lockey, R., Calabria, C., Chacko, T., Finegold, I., y col. (2011). "Allergen immunotherapy: a practice parameter third update." *J Allergy Clin Immunol* **127** S1-S5.
- Cuesta-Herranz, J., Barber, D., Blanco, C., Cisteró-Bahima, A., Crespo, J. F., Fernández-Rivas, M., y col. (2010). "Differences among pollen-allergic patients with and without plant food allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **153** 182-192.
- Charpin, D., Calleja, M., Lahoz, C., Pichot, C. y Waisel, Y. (2005). "Allergy to cypress pollen." *Allergy* **60** 293-301.
- Chaudhry, R. Q. y Oppenheimer, J. J. (2012). "Update on food allergy in adults." *Curr Allergy Asthma Rep* **12** 311-320.
- Chen, C. y Chen, Z. (2000). "Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco." *Plant Mol Biol* **42** 387-396.
- Chen, L., Garrett, T. P., Fincher, G. B. y Hoj, P. B. (1995). "A tetrad of ionizable amino acids is important for catalysis in barley  $\beta$ -glucanases." *J Biol Chem* **270** 8093-8101.

- D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., y col. (2007). "Allergenic pollen and pollen allergy in Europe." *Allergy* **62** 976-990.
- Dall'Antonia, Y., Pavkov, T., Fuchs, H., Breiteneder, H. y Keller, W. (2005). "Crystallization and preliminary structure determination of the plant food allergen Pru av 2." *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **61** 186-188.
- de Boer, E. M. y van Ketel, W. G. (1984). "Contact allergy to an olive oil containing ointment." *Contact Dermatitis* **11** 128-129.
- de Lagran, Z. M., de Frutos, F. J., de Arribas, M. G. y Vanaclocha-Sebastián, F. (2009). "Contact urticaria to raw potato." *Dermatol Online J* **15** 14.
- Di Felice, G., Barletta, B., Tinghino, R. y Pini, C. (2001). "Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens." *Int Arch Allergy Immunol* **125** 280-289.
- Dobrowolska, D., Hein, S., Oosterbaan, A., Wagner, S., Clark, J. y Skovsgaard, J. P. (2011). "A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture." *Forestry* **84** 16.
- Docena, G. H., Fernandez, R., Chirido, F. G. y Fossati, C. A. (1996). "Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk." *Allergy* **51** 412-416.
- Duffort, O., Palomares, O., Lombardero, M., Villalba, M., Barber, D., Rodriguez, R. y Polo, F. (2006). "Variability of Ole e 9 allergen in olive pollen extracts: relevance of minor allergens in immunotherapy treatments." *Int Arch Allergy Immunol* **140** 131-138.
- Elsayed, S. y Aas, K. (1971). "Characterization of a major allergen (cod). Observations on effect of denaturation on the allergenic activity." *J Allergy* **47** 283-291.
- Enríquez-Matas, A., Escudero, C., Lombardero, M., Ibañez-Sandín, M., Calderón, S., Muñoz, C. y Laso, T. (2007). "Anaphylactic shock due to olive fruits." *Allergy* **62**.
- Esteve, C., Canas, B., Moreno-Gordaliza, E., Del Río, C., García, M. C. y Marina, M. L. (2011). "Identification of olive (*Olea europaea*) pulp proteins by matrix-

- assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and nano-liquid chromatography tandem mass spectrometry." *J Agric Food Chem* **59** 12093-12101.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., y col. (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." *J Clin Invest* **119** 3573-3585.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. y Wallach, D. F. (1971). "Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane." *Biochemistry* **10** 2606-2617.
- Faus, I. (2000). "Recent developments in the characterization and biotechnological production of sweet-tasting proteins." *Appl Microbiol Biotechnol* **53** 145-151.
- Feo Brito, F., Mur Gimeno, P., Bartolome, B., Castro, A. y Guerra, F. (2011). "Anaphylaxis due to olive fruit after pollen immunotherapy." *J Investig Allergol Clin Immunol* **21** 160-161.
- Ferreira, F., Briza, P., Infuhr, D., Schmidt, G., Wallner, M., Wopfner, N., y col. (2006). "Modified recombinant allergens for safer immunotherapy." *Inflamm Allergy Drug Targets* **5** 5-14.
- Fierens, E., Gebruers, K., Voet, A. R., De Maeyer, M., Courtin, C. M. y Delcour, J. A. (2009). "Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor." *J Enzyme Inhib Med Chem* **24** 646-654.
- Fierens, E., Rombouts, S., Gebruers, K., Goesaert, H., Brijs, K., Beaugrand, J., y col. (2007). "TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family." *Biochem J* **403** 583-591.
- Fils-Lycaon, B. R., Wiersma, P. A., Eastwell, K. C. y Sautiere, P. (1996). "A cherry protein and its gene, abundantly expressed in ripening fruit, have been identified as thaumatin-like." *Plant Physiol* **111** 269-273.
- Florido, J. F., Quiralte, J., Arias, J. M., Sáenz, B. y Martín, E. (2002). "An allergen from *Olea europaea* pollen (Ole e 7) is associated with plant-derived food anaphylaxis." *Allergy* **57 Suppl 71** 53-59.

- Fu, H., Feng, J., Aboukhaddour, R., Cao, T., Hwang, S. F. y Strelkov, S. E. (2013). "An exo-1,3- $\beta$ -glucanase GLU1 contributes to the virulence of the wheat tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*." *Fungal Biol* **117** 673-681.
- Fuchs, H. C., Bohle, B., Dall'Antonia, Y., Radauer, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Mari, A., y col. (2006). "Natural and recombinant molecules of the cherry allergen Pru av 2 show diverse structural and B cell characteristics but similar T cell reactivity." *Clin Exp Allergy* **36** 359-368.
- Fuchs, H. C., Hoffmann-Sommergruber, K., Wagner, B., Krebitz, M., Scheiner, O. y Breiteneder, H. (2002). "Heterologous Expression in *Nicotiana Benthamiana* of Cap a 1, a Thaumatin-Like Protein and Major Allergen From Bell Pepper (*Capsicum Annuum*)." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109**.
- Fujimura, T., Futamura, N., Midoro-Horiuti, T., Togawa, A., Goldblum, R. M., Yasueda, H., y col. (2007). "Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen." *Allergy* **62** 547-553.
- Gavrovic-Jankulovic, M., clrkovic, T., Vuckovic, O., Atanaskovic-Markovic, M., Petersen, A., Gojgic, G., y col. (2002). "Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen." *J Allergy Clin Immunol* **110** 805-810.
- Gawchik, S. M. (2011). "Latex allergy." *Mt Sinai J Med* **78** 759-772.
- Gemmill, T. R. y Trimble, R. B. (1999). "Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species." *Biochim Biophys Acta* **1426** 227-237.
- Ghaemmaghami, A. M., Gough, L., Sewell, H. F. y Shakib, F. (2002). "The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level." *Clin Exp Allergy* **32** 1468-1475.
- Ghosh, R. y Chakrabarti, C. (2008). "Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein." *Planta* **228** 883-890.
- Gómez Torrijos, E., Galindo, P. A., Borja, J., Feo, F., García Rodríguez, R. y Mur, P. (2001). "Allergic contact urticaria from raw potato." *J Investig Allergol Clin Immunol* **11** 129.

- González-Buitrago, J. M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F. y Davila, I. (2007). "Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases." *Clin Chim Acta* **385** 21-27.
- González, E. M., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2000). "Allergenic cross-reactivity of olive pollen." *Allergy* **55** 658-663.
- Gough, L., Schulz, O., Sewell, H. F. y Shakib, F. (1999). "The cysteine protease activity of the major dust mite allergen Der p 1 selectively enhances the immunoglobulin E antibody response." *J Exp Med* **190** 1897-1902.
- Grenier, J., Potvin, C., Trudel, J. y Asselin, A. (1999). "Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans." *Plant J* **19** 473-480.
- Guillén, D., Sánchez, S. y Rodríguez-Sanoja, R. (2010). "Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles." *Appl Microbiol Biotechnol* **85** 1241-1249.
- Hauser, M., Asam, C., Himly, M., Palazzo, P., Voltolini, S., Montanari, C., y col. (2011). "Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals." *Clin Exp Allergy* **41** 1804-1814.
- Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F. y Egger, M. (2010). "Panallergens and their impact on the allergic patient." *Allergy Asthma Clin Immunol* **6** 1.
- Helm, R. M., Burks, W., Williams, L. W., Milne, D. E. y Brenner, R. J. (1993). "Identification of cockroach aeroallergens from living cultures of German or American cockroaches." *Int Arch Allergy Immunol* **101** 359-363.
- Hemmer, W., Focke, M., Wantke, F., Gotz, M., Jarisch, R. y Jager, S. (2000). "Ash (*Fraxinus excelsior*)-pollen allergy in central Europe: specific role of pollen panallergens and the major allergen of ash pollen, Fra e 1." *Allergy* **55** 923-930.
- Hird, D. L., Worrall, D., Hodge, R., Smartt, S., Paul, W. y Scott, R. (1993). "The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to  $\beta$ -1,3-glucanases." *Plant J* **4** 1023-1033.
- Hofmann, C., Scheurer, S., Rost, K., Graulich, E., Jamin, A., Foetisch, K., y col. (2013). "Cor a 1-reactive T cells and IgE are predominantly cross-reactive to Bet v 1 in



- patients with birch pollen-associated food allergy to hazelnut." *J Allergy Clin Immunol* **131** 1384-1392 e1386.
- Hougaard, M. G., Menne, T. y Sosted, H. (2012). "Occupational eczema and asthma in a hairdresser caused by hair-bleaching products." *Dermatitis* **23** 284-287.
- Hrabina, M., Purohit, A., Oster, J. P., Papanikolaou, I., Jain, K., Pascal, P., y col. (2007). "Standardization of an ash (*Fraxinus excelsior*) pollen allergen extract." *Int Arch Allergy Immunol* **142** 11-18.
- Hsi, K. L., Chen, L., Hawke, D. H., Zieske, L. R. y Yuan, P. M. (1991). "A general approach for characterizing glycosylation sites of glycoproteins." *Anal Biochem* **198** 238-245.
- Hsieh, L. S., Moos, M., Jr. y Lin, Y. (1995). "Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening." *J Allergy Clin Immunol* **96** 960-970.
- Huecas, S., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2001). "Ole e 9, a major olive pollen allergen is a 1,3- $\beta$ -glucanase. Isolation, characterization, amino acid sequence, and tissue specificity." *J Biol Chem* **276** 27959-27966.
- Inschlag, C., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Ahorn, H., Ebner, C., Scheiner, O. y Breiteneder, H. (1998). "Biochemical characterization of Pru a 2, a 23-kD thaumatin-like protein representing a potential major allergen in cherry (*Prunus avium*)." *Int Arch Allergy Immunol* **116** 22-28.
- Ipsen, H. y Lowenstein, H. (1983). "Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*)." *J Allergy Clin Immunol* **72** 150-159.
- Isaksson, M. y Bruze, M. (1999). "Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in a masseur." *J Am Acad Dermatol* **41** 312-315.
- Ivanciuc, O., Midoro-Horiuti, T., Schein, C. H., Xie, L., Hillman, G. R., Goldblum, R. M. y Braun, W. (2009). "The property distance index PD predicts peptides that cross-react with IgE antibodies." *Mol Immunol* **46** 873-883.

- Jami, S. K., Swathi Anuradha, T., Guruprasad, L. y Kirti, P. B. (2007). "Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*).\" J Plant Physiol **164** 238-252.
- Jensen-Jarolim, E., Santner, B., Leitner, A., Grimm, R., Scheiner, O., Ebner, C. y Breiteneder, H. (1998). "Bell peppers (*Capsicum annuum*) express allergens (profilin, pathogenesis-related protein P23 and Bet v 1) depending on the horticultural strain.\" Int Arch Allergy Immunol **116** 103-109.
- Jeong, J., Kim, Y., Kyung Seong, J. y Lee, K. J. (2012). "Comprehensive identification of novel post-translational modifications in cellular peroxiredoxin 6.\" Proteomics **12** 1452-1462.
- Kannan Krishnan, K. y Moens, P. D. J. (2009). "Structure and function of profilins.\" Biophys Rev **1** 11.
- Kaplan, M. H. (2013). "Th9 cells: differentiation and disease.\" Immunol Rev **252** 104-115.
- Karamloo, F., Wangorsch, A., Kasahara, H., Davin, L. B., Hausteine, D., Lewis, N. G. y Vieths, S. (2001). "Phenylcoumaran benzylic ether and isoflavonoid reductases are a new class of cross-reactive allergens in birch pollen, fruits and vegetables.\" Eur J Biochem **268** 5310-5320.
- Kay, A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases. First of two parts.\" N Engl J Med **344** 30-37.
- Kelly, L. A., Erwin, E. A. y Platts-Mills, T. A. (2012). "The indoor air and asthma: the role of cat allergens.\" Curr Opin Pulm Med **18** 29-34.
- Kennedy, J. L., Stallings, A. P., Platts-Mills, T. A., Oliveira, W. M., Workman, L., James, H. R., y col. (2013). "Galactose- $\alpha$ -1,3-galactose and delayed anaphylaxis, angioedema, and urticaria in children.\" Pediatrics **131** e1545-1552.
- Kim, J. E., Kim, S. H., Choi, G. S., Ye, Y. M. y Park, H. S. (2010). "Detection of specific IgE antibodies to cefotiam-HSA conjugate by ELISA in a nurse with occupational anaphylaxis.\" Allergy **65** 791-792.

- Koiwa, H., Kato, H., Nakatsu, T., Oda, J., Yamada, Y. y Sato, F. (1999). "Crystal structure of tobacco PR-5d protein at 1.8 Å resolution reveals a conserved acidic cleft structure in antifungal thaumatin-like proteins." *J Mol Biol* **286** 1137-1145.
- Krebitz, M., Wagner, B., Ferreira, F., Peterbauer, C., Campillo, N., Witty, M., y col. (2003). "Plant-based heterologous expression of Mal d 2, a thaumatin-like protein and allergen of apple (*Malus domestica*), and its characterization as an antifungal protein." *J Mol Biol* **329** 721-730.
- Kroeger, J. y Geitmann, A. (2012). "The pollen tube paradigm revisited." *Curr Opin Plant Biol* **15** 618-624.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* **157** 27.
- Larché, M., Akdis, C. A. y Valenta, R. (2006). "Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy." *Nat Rev Immunol* **6** 761-771.
- Ledesma, A., Rodríguez, R. y Villalba, M. (1998). "Olive-pollen profilin. Molecular and immunologic properties." *Allergy* **53** 520-526.
- Ledesma, A., Villalba, M., Batanero, E. y Rodríguez, R. (1998). "Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins (polcalcins) involved in allergy." *Eur J Biochem* **258** 454-459.
- Lehto, M., Airaksinen, L., Puustinen, A., Tillander, S., Hannula, S., Nyman, T., y col. (2010). "Thaumatococcus-like protein and baker's respiratory allergy." *Ann Allergy Asthma Immunol* **104** 139-146.
- Leone, P., Menu-Bouaouiche, L., Peumans, W. J., Payan, F., Barre, A., Roussel, A., y col. (2006). "Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å." *Biochimie* **88** 45-52.
- Li, X. M., Serebrisky, D., Lee, S. Y., Huang, C. K., Bardina, L., Schofield, B. H., y col. (2000). "A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses." *J Allergy Clin Immunol* **106** 150-158.

- Liccardi, G., D'Amato, M. y D'Amato, G. (1996). "*Oleaceae* pollinosis: a review." *Int Arch Allergy Immunol* **111** 210-217.
- Linthorst, H. J., Melchers, L. S., Mayer, A., van Roekel, J. S., Cornelissen, B. J. y Bol, J. F. (1990). "Analysis of gene families encoding acidic and basic  $\beta$ -1,3-glucanases of tobacco." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** 8756-8760.
- Linthorst, H. J., van Loon, L. C., van Rossum, C. M., Mayer, A., Bol, J. F., van Roekel, J. S., y col. (1990). "Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco." *Mol Plant Microbe Interact* **3** 252-258.
- Liu, B., Lu, Y., Xin, Z. y Zhang, Z. (2009). "Identification and antifungal assay of a wheat beta-1,3-glucanase." *Biotechnol Lett* **31** 1005-1010.
- Liu, J. J., Sturrock, R. y Ekramoddoullah, A. K. (2010). "The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function." *Plant Cell Rep* **29** 419-436.
- Lombardero, M., Heymann, P. W., Platts-Mills, T. A., Fox, J. W. y Chapman, M. D. (1990). "Conformational stability of B cell epitopes on group I and group II *Dermatophagoides* spp. allergens. Effect of thermal and chemical denaturation on the binding of murine IgG and human IgE antibodies." *J Immunol* **144** 1353-1360.
- Lopata, A. L. y Jeebhay, M. F. (2013). "Airborne seafood allergens as a cause of occupational allergy and asthma." *Curr Allergy Asthma Rep* **13** 288-297.
- Lopata, A. L. y Lehrer, S. B. (2009). "New insights into seafood allergy." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9** 270-277.
- Lotan, T., Ori, N. y Fluhr, R. (1989). "Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers." *Plant Cell* **1** 881-887.
- Maleki, S. J., Teuber, S. S., Cheng, H., Chen, D., Comstock, S. S., Ruan, S. y Schein, C. H. (2011). "Computationally predicted IgE epitopes of walnut allergens contribute to cross-reactivity with peanuts." *Allergy* **66** 1522-1529.

- Malmkvist Padoan, S., Pettersson, A. y Svensson, A. (1990). "Olive oil as a cause of contact allergy in patients with venous eczema, and occupationally." *Contact Dermatitis* **23** 73-76.
- Mani, T., Sivakumar, K. C. y Manjula, S. (2012). "Expression and functional analysis of two osmotin (PR5) isoforms with differential antifungal activity from *Piper colubrinum*: prediction of structure-function relationship by bioinformatics approach." *Mol Biotechnol* **52** 251-261.
- Marsh, D. G., Meyers, D. A., Freidhoff, L. R., Ehrlich-Kautzky, E., Roebber, M., Norman, P. S., y col. (1982). "HLA-Dw2: a genetic marker for human immune response to short ragweed pollen allergen Ra5. II. Response after ragweed immunotherapy." *J Exp Med* **155** 1452-1463.
- Mas, S., Barderas, R., Colás, C., Quiralte, J., Rodríguez, R. y Villalba, M. (2012). "The natural profilin from Russian thistle (*Salsola kali*) contains a low IgE-binding ability isoform--molecular and immunological characterization." *FEBS J* **279** 4338-4349.
- Mas, S., Torres, M., Garrido-Arandia, M., Salamanca, G., Castro, L., Barral, P., y col. (2014). "Ash pollen immunoproteomics: Identification, immunologic characterization, and sequencing of 6 new allergens." *J Allergy Clin Immunol*.
- Mas, S., Torres, M., Garrido, M., Salamanca, G., Castro, L., Barral, P., y col. (2014). "Ash pollen immunoproteomics: identification, immunological characterization and sequencing of six new allergens." *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. y Boller, T. (1988). "Antifungal hydrolases in pea tissue : I. Purification and characterization of two chitinases and two  $\beta$ -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection." *Plant Physiol* **87** 325-333.
- Memelink, J., Linthorst, H. J., Schilperoort, R. A. y Hoge, J. H. (1990). "Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns." *Plant Mol Biol* **14** 119-126.
- Menu-Bouaouiche, L., Vriet, C., Peumans, W. J., Barre, A., Van Damme, E. J. y Rouge, P. (2003). "A molecular basis for the endo-beta 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits." *Biochimie* **85** 123-131.

- Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R. M., Kurosky, A., Wood, T. G. y Brooks, E. G. (2000). "Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen." J Immunol **164** 2188-2192.
- Min, K., Ha, S. C., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Yun, D. J. y Kim, K. K. (2004). "Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein." Proteins **54** 170-173.
- Minton, K. (2008). "Allergy and Asthma: What 'drives' IL-4 versus IL-13 signalling?" Nature Reviews Immunology **8** 166-167.
- Mohapatra, S. S., Lockey, R. F. y Polo, F. (2008). "Weed pollen allergens." Clin Allergy Immunol **21** 127-139.
- Moser, F., Irwin, D., Chen, S. y Wilson, D. B. (2008). "Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8." Biotechnol Bioeng **100** 1066-1077.
- Moser, M., Cramer, R., Brust, E., Suter, M. y Menz, G. (1994). "Diagnostic value of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a for skin testing and serology." J Allergy Clin Immunol **93** 1-11.
- Mur Gimeno, P., Martín Iglesias, A., Lombardero Vega, M., Bautista Martínez, P. y Ventura López, P. (2013). "Occupational wheat contact dermatitis and treatment with omalizumab." J Investig Allergol Clin Immunol **23** 287-288.
- Narasimhan, M. L., Bressan, R. A., D'Urzo, M. P., Jenks, M. A. y Mengiste, T. (2009). "Unexpected Turns and Twists in Structure/Function of PR-Proteins that Connect Energy Metabolism and Immunity." Adv. Bot **51** 50.
- Nelson, N. (1944). "A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose." J Biol Chem **153** 375-380.
- Niederberger, V., Purohit, A., Oster, J. P., Spitzauer, S., Valenta, R. y Pauli, G. (2002). "The allergen profile of ash (*Fraxinus excelsior*) pollen: cross-reactivity with allergens from various plant species." Clin Exp Allergy **32** 933-941.
- Oh, D. H., Song, K. J., Shin, Y. U. y Chung, W. I. (2000). "Isolation of a cDNA encoding a 31-kDa, pathogenesis-related 5/thaumatin-like (PR5/TL) protein abundantly expressed in apple fruit (*Nalus domestica* cv. Fuji)." Biosci Biotechnol Biochem **64** 355-362.

- Osmond, R. I., Hrmova, M., Fontaine, F., Imberty, A. y Fincher, G. B. (2001). "Binding interactions between barley thaumatin-like proteins and (1,3)- $\beta$ -D-glucans. Kinetics, specificity, structural analysis and biological implications." *Eur J Biochem* **268** 4190-4199.
- Oxford Forestry Institute. y Boshier David. (2005). Ash species in Europe : biological characteristics and practical guidelines for sustainable use. Oxford, Oxford Forestry Institute.
- Pala, G., Pignatti, P., Perfetti, L., Gentile, E. y Moscato, G. (2012). "Occupational allergic contact urticaria to crustacean in a cook." *J Investig Allergol Clin Immunol* **22** 142-143.
- Palacín, A., Gómez-Casado, C., Rivas, L. A., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., y col. (2012). "Graph based study of allergen cross-reactivity of plant lipid transfer proteins (LTPs) using microarray in a multicenter study." *PLoS One* **7** e50799.
- Palacín, A., Quirce, S., Armentia, A., Fernández-Nieto, M., Pacios, L. F., Asensio, T., y col. (2007). "Wheat lipid transfer protein is a major allergen associated with baker's asthma." *J Allergy Clin Immunol* **120** 1132-1138.
- Palacín, A., Rivas, L. A., Gómez-Casado, C., Aguirre, J., Tordesillas, L., Bartra, J., y col. (2012). "The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray." *PLoS One* **7** e44088.
- Palacín, A., Rodríguez, J., Blanco, C., Lopez-Torrejon, G., Sanchez-Monge, R., Varela, J., y col. (2008). "Immunoglobulin E recognition patterns to purified Kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) allergens in patients sensitized to Kiwi with different clinical symptoms." *Clin Exp Allergy* **38** 1220-1228.
- Palacín, A., Tordesillas, L., Gamboa, P., Sánchez-Monge, R., Cuesta-Herranz, J., Sanz, M. L., y col. (2010). "Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens." *Clin Exp Allergy* **40** 1422-1430.
- Palomares, O. (2005). Proteínas de reserva de mostaza amarilla y 1,3- $\beta$ -glucanasa de polen de olivo como modelos de estudio de proteínas alergénicas. Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Madrid, Universidad Complutense de Madrid.

- Palomares, O., Alcantara, M., Quiralte, J., Villalba, M., Garzon, F. y Rodriguez, R. (2008). "Airway disease and thaumatin-like protein in an olive-oil mill worker." *N Engl J Med* **358** 1306-1308.
- Palomares, O., Batanero, E., Cañamero, M., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2006). "Prophylactic intranasal treatment with fragments of 1,3-beta-glucanase olive pollen allergen prevents airway inflammation in a murine model of type I allergy." *Int Arch Allergy Immunol* **139** 175-180.
- Palomares, O., Fernandez-Nieto, M., Villalba, M., Rodríguez, R. y Cuesta-Herranz, J. (2008). "Occupational allergy in a researcher due to Ole e 9, an allergenic 1,3- $\beta$ -glucanase from olive pollen." *Allergy* **63** 784-785.
- Palomares, O., Villalba, M., Quiralte, J., Polo, F. y Rodríguez, R. (2005). "1,3- $\beta$ -glucanases as candidates in latex-pollen-vegetable food cross-reactivity." *Clin Exp Allergy* **35** 345-351.
- Palomares, O., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2003). "The C-terminal segment of the 1,3- $\beta$ -glucanase Ole e 9 from olive (*Olea europaea*) pollen is an independent domain with allergenic activity: expression in *Pichia pastoris* and characterization." *Biochem J* **369** 593-601.
- Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A. K., Akkoc, T., Akdis, M. y Akdis, C. A. (2010). "Role of Treg in immune regulation of allergic diseases." *Eur J Immunol* **40** 1232-1240.
- Parre, E. y Geitmann, A. (2005). "More than a leak sealant. The mechanical properties of callose in pollen tubes." *Plant Physiol* **137** 274-286.
- Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., y col. (2003). "Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin." *J Allergy Clin Immunol* **111** 350-359.
- Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Pérez-Martínez, P., López-Segura, F. y López-Miranda, J. (2007). "The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone." *Mol Nutr Food Res* **51** 1199-1208.
- Peumans, W. J., Barre, A., Derycke, V., Rouge, P., Zhang, W., May, G. D., y col. (2000). "Purification, characterization and structural analysis of an abundant  $\beta$ -1,3-glucanase from banana fruit." *Eur J Biochem* **267** 1188-1195.



- Prado, N., Marazuela, E. G., Segura, E., Fernández-García, H., Villalba, M., Thery, C., y col. (2008). "Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction." *J Immunol* **181** 1519-1525.
- Quirce, S., Díez Gómez, M. L., Hinojosa, M., Cuevas, M., Urena, V., Rivas, M. F., y col. (1989). "Housewives with raw potato-induced bronchial asthma." *Allergy* **44** 532-536.
- Quirce, S., Fernandez-Nieto, M., Escudero, C., Cuesta, J., de Las Heras, M. y Sastre, J. (2006). "Bronchial responsiveness to bakery-derived allergens is strongly dependent on specific skin sensitivity." *Allergy* **61** 1202-1208.
- Rabjohn, P., Helm, E. M., Stanley, J. S., West, C. M., Sampson, H. A., Burks, A. W. y Bannon, G. A. (1999). "Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen Ara h 3." *J Clin Invest* **103** 535-542.
- Radauer, C. y Breiteneder, H. (2006). "Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution." *J Allergy Clin Immunol* **117** 141-147.
- Rebmann, G., Mauch, F. y Dudler, R. (1991). "Sequence of a wheat cDNA encoding a pathogen-induced thaumatin-like protein." *Plant Mol Biol* **17** 283-285.
- Receveur-Brechot, V., Czjzek, M., Barre, A., Roussel, A., Peumans, W. J., Van Damme, E. J. y Rouge, P. (2006). "Crystal structure at 1.45-Å resolution of the major allergen endo- $\beta$ -1,3-glucanase of banana as a molecular basis for the latex-fruit syndrome." *Proteins* **63** 235-242.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., González, E. M., Monsalve, R. I., Huecas, S., y col. (2002). "Allergenic diversity of the olive pollen." *Allergy* **57 Suppl 71** 6-16.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O., Quiralte, J., Salamanca, G., y col. (2007). "Olive pollen recombinant allergens: value in diagnosis and immunotherapy." *J Investig Allergol Clin Immunol* **17 Suppl 1** 4-10.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Batanero, E., Palomares, O. y Salamanca, G. (2007). "Emerging pollen allergens." *Biomed Pharmacother* **61** 1-7.
- Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R. I. y Batanero, E. (2001). "The spectrum of olive pollen allergens." *Int Arch Allergy Immunol* **125** 185-195.

- Sackesen, C., Assa'ad, A., Baena-Cagnani, C., Ebisawa, M., Fiocchi, A., Heine, R. G., y col. (2011). "Cow's milk allergy as a global challenge." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **11** 243-248.
- Salamanca, G., Rodriguez, R., Quiralte, J., Moreno, C., Pascual, C. Y., Barber, D. y Villalba, M. (2010). "Pectin methylesterases of pollen tissue, a major allergen in olive tree." *FEBS J* **277** 2729-2739.
- Salcedo, G., Díaz-Perales, A. y Sánchez-Monge, R. (2001). "The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **1** 177-183.
- Salcedo, G., Quirce, S. y Díaz-Perales, A. (2011). "Wheat allergens associated with Baker's asthma." *J Investig Allergol Clin Immunol* **21** 81-92; quiz 94.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Selles, F. J., Barber, D. y Salcedo, G. (1999). "Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy." *J Allergy Clin Immunol* **103** 514-519.
- Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S. y Plasencia, J. (2012). "Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize  $\beta$ -1,3-glucanase activities involved in defense response." *Planta* **235** 965-978.
- Sasseville, D. y Theriault, M. (2012). "Occupational contact urticaria caused by polyvinylchloride gloves." *Contact Dermatitis* **66** 49-50.
- Sastre, I., Rodríguez-Pérez, R., García, F., Juste, S., Moneo, I. y Caballero, M. L. (2013). "Occupational allergic rhinoconjunctivitis and bronchial asthma induced by goat cheese." *Occup Environ Med* **70** 141-142.
- Schenk, S., Breiteneder, H., Susani, M., Najafian, N., Laffer, S., Duchene, M., y col. (1995). "T-cell epitopes of Phl p 1, major pollen allergen of timothy grass (*Phleum pratense*): evidence for crossreacting and non-crossreacting T-cell epitopes within grass group I allergens." *J Allergy Clin Immunol* **96** 986-996.

- Shanti, K. N., Martin, B. M., Nagpal, S., Metcalfe, D. D. y Rao, P. V. (1993). "Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes." *J Immunol* **151** 5354-5363.
- Sharma, P., Gaur, S. N. y Arora, N. (2013). "In silico identification of IgE-binding epitopes of osmotin protein." *PLoS One* **8** e54755.
- Shen, S. H., Chretien, P., Bastien, L. y Slilaty, S. N. (1991). "Primary sequence of the glucanase gene from *Oerskovia xanthineolytica*. Expression and purification of the enzyme from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **266** 1058-1063.
- Shi, P., Yao, G., Yang, P., Li, N., Luo, H., Bai, Y., y col. (2010). "Cloning, characterization, and antifungal activity of an endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Streptomyces* sp. S27." *Appl Microbiol Biotechnol* **85** 1483-1490.
- Silvar, C., Merino, F. y Díaz, J. (2009). "Resistance in pepper plants induced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* involves different defence-related genes." *Plant Biol (Stuttg)* **11** 68-74.
- Sirvent, S., Palomares, O., Cuesta-Herranz, J., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2012). "Analysis of the structural and immunological stability of 2S albumin, nonspecific lipid transfer protein, and profilin allergens from mustard seeds." *J Agric Food Chem*.
- Sirvent, S., Tordesillas, L., Villalba, M., Díaz-Perales, A., Cuesta-Herranz, J., Salcedo, G. y Rodríguez, R. (2011). "Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity." *Ann Allergy Asthma Immunol* **106** 429-435.
- Smole, U., Bublin, M., Radauer, C., Ebner, C. y Breiteneder, H. (2008). "Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing." *Int Arch Allergy Immunol* **147** 289-298.
- Soman, K. V., Midoro-Horiuti, T., Ferreón, J. C., Goldblum, R. M., Brooks, E. G., Kurosky, A., y col. (2000). "Homology modeling and characterization of IgE binding epitopes of mountain cedar allergen Jun a 3." *Biophys J* **79** 1601-1609.
- Somogyi, M. (1952). "Notes on sugar determination." *J Biol Chem* **195** 19-23.

- Sotkovsky, P., Sklenar, J., Halada, P., Cinova, J., Setinova, I., Kainarova, A., y col. (2011). "A new approach to the isolation and characterization of wheat flour allergens." *Clin Exp Allergy* **41** 1031-1043.
- Szalai, K., Kopp, T., Lukschal, A., Stremnitzer, C., Wallmann, J., Starkl, P., y col. (2012). "Establishing an allergic eczema model employing recombinant house dust mite allergens Der p 1 and Der p 2 in BALB/c mice." *Exp Dermatol* **21** 842-846.
- Thanseem, I., Joseph, A. y Thulaseedharan, A. (2005). "Induction and differential expression of  $\beta$ -1,3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible *Hevea* clones in response to infection by *Phytophthora meadii*." *Tree Physiol* **25** 1361-1368.
- Thimmapuram, J., Ko, T. S. y Korban, S. S. (2001). "Characterization and expression of  $\beta$ -1,3-glucanase genes in peach." *Mol Genet Genomics* **265** 469-479.
- Thomas, B. R., Romero, G. O., Nevins, D. J. y Rodríguez, R. L. (2000). "New perspectives on the endo-beta-glucanases of glycosyl hydrolase Family 17." *Int J Biol Macromol* **27** 139-144.
- Torbati, M., Arzanlou, M., Azadmard-damirchi, S., Babai-ahari, A. y Alijani, S. (2013). "Effect of fungal species involved in the olive fruit rot on the qualitative properties of olive oil." *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*.
- Tordesillas, L., Sirvent, S., Díaz-Perales, A., Villalba, M., Cuesta-Herranz, J., Rodríguez, R. y Salcedo, G. (2011). "Plant lipid transfer protein allergens: no cross-reactivity between those from foods and olive and *Parietaria* pollen." *Int Arch Allergy Immunol* **156** 291-296.
- Torres, M., Alvarez-García, E., Bartra, J., Alcantara, M., Palomares, O., Villalba, M., Rodríguez, R. (2014). "The allergenic structure of the thaumatin-like protein Ole e 13 is degraded by processing of raw olive fruits." *J Investig Allergol Clin Immunol* **24** 154-160.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** 4350-4354.
- Treviño, M. A., Palomares, O., Castrillo, I., Villalba, M., Rodríguez, R., Rico, M., y col. (2008). "Solution structure of the C-terminal domain of Ole e 9, a major allergen of olive pollen." *Protein Sci* **17** 371-376.

- Trudel, J., Grenier, J., Potvin, C. y Asselin, A. (1998). "Several thaumatin-like proteins bind to  $\beta$ -1,3-glucans." *Plant Physiol* **118** 1431-1438.
- Ünsel, M., Ardeniz, O., Mete, N., Ersoy, R., Sin, A. Z., Gulbahar, O. y Kokuludag, A. (2009). "Food allergy due to olive." *J Investig Allergol Clin Immunol* **19** 497-499.
- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. y Eijsink, V. G. (2005). "The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation." *J Biol Chem* **280** 28492-28497.
- Valenta, R., Duchene, M., Vrtala, S., Birkner, T., Ebner, C., Hirschwehr, R., y col. (1991). "Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy." *J Allergy Clin Immunol* **88** 889-894.
- Valenta, R., Lidholm, J., Niederberger, V., Hayek, B., Kraft, D. y Gronlund, H. (1999). "The recombinant allergen-based concept of component-resolved diagnostics and immunotherapy (CRD and CRIT)." *Clin Exp Allergy* **29** 896-904.
- Valenta, R., Vrtala, S., Ebner, C., Kraft, D. y Scheiner, O. (1992). "Diagnosis of grass pollen allergy with recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens." *Int Arch Allergy Immunol* **97** 287-294.
- van der Wel, H., van Soest, T. C. y Royers, E. C. (1975). "Crystallization and crystal data of thaumatin I, a sweet-tasting protein from *Thaumatococcus daniellii* benth." *FEBS Lett* **56** 316-317.
- Van Eldik, G. J., Wingens, M., Ruiter, R. K., Van Herpen, M. M., Schrauwen, J. A. y Wullems, G. J. (1996). "Molecular analysis of a pistil-specific gene expressed in the stigma and cortex of *Solanum tuberosum*." *Plant Mol Biol* **30** 171-176.
- van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. (2006). "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." *Annu Rev Phytopathol* **44** 135-162.
- van Ree, R., Hoffman, D. R., van Dijk, W., Brodard, V., Mahieu, K., Koeleman, C. A., y col. (1995). "Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins." *J Allergy Clin Immunol* **95** 970-978.

- van Ree, R., van Leeuwen, W. A. y Aalberse, R. C. (1998). "How far can we simplify in vitro diagnostics for grass pollen allergy?: A study with 17 whole pollen extracts and purified natural and recombinant major allergens." *J Allergy Clin Immunol* **102** 184-190.
- Varghese, J. N., Garrett, T. P., Colman, P. M., Chen, L., Hoj, P. B. y Fincher, G. B. (1994). "Three-dimensional structures of two plant beta-glucan endohydrolases with distinct substrate specificities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** 2785-2789.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., y col. (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* **9** 1341-1346.
- Vercelli, D. (2008). "Discovering susceptibility genes for asthma and allergy." *Nat Rev Immunol* **8** 169-182.
- Verdino, P., Barderas, R., Villalba, M., Westritschnig, K., Valenta, R., Rodriguez, R. y Keller, W. (2008). "Three-dimensional structure of the cross-reactive pollen allergen Che a 3: visualizing cross-reactivity on the molecular surfaces of weed, grass, and tree pollen allergens." *J Immunol* **180** 2313-2321.
- Verma, D. P. y Hong, Z. (2005). "The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation." *Trends Plant Sci* **10** 159-165.
- Vernon, M. K., Wiklund, I., Bell, J. A., Dale, P. y Chapman, K. R. (2012). "What do we know about asthma triggers? a review of the literature." *J Asthma* **49** 991-998.
- Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L. M., Monsalve, R. I., González de la Peña, M. A., y col. (1993). "The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen." *Eur J Biochem* **216** 863-869.
- Villalba, M., Batanero, E., Monsalve, R. I., González de la Peña, M. A., Lahoz, C. y Rodríguez, R. (1994). "Cloning and expression of Ole e I, the major allergen from olive tree pollen. Polymorphism analysis and tissue specificity." *J Biol Chem* **269** 15217-15222.
- Villalba, M., Rodríguez, R. y Batanero, E. (2013). "The spectrum of olive pollen allergens. From structures to diagnosis and treatment." *Methods*.

- Visser, M. J., Verberk, M. M., van Dijk, F. J., Bakker, J. G., Bos, J. D. y Kezic, S. (2013). "Wet work and hand eczema in apprentice nurses; part I of a prospective cohort study." *Contact Dermatitis*.
- Vogeli-Lange, R., Frundt, C., Hart, C. M., Nagy, F. y Meins, F., Jr. (1994). "Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I  $\beta$ -1,3-glucanase B promoter." *Plant Mol Biol* **25** 299-311.
- Vrtala, S., Mayer, P., Ferreira, F., Susani, M., Sehon, A. H., Kraft, D. y Valenta, R. (1996). "Induction of IgE antibodies in mice and rhesus monkeys with recombinant birch pollen allergens: different allergenicity of Bet v 1 and Bet v 2." *J Allergy Clin Immunol* **98** 913-921.
- Wagner, S., Radauer, C., Bublin, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Kopp, T., Greisenegger, E. K., y col. (2008). "Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy." *J Allergy Clin Immunol* **121** 246-252.
- Wagner, S., Radauer, C., Hafner, C., Fuchs, H., Jensen-Jarolim, E., Wuthrich, B., y col. (2004). "Characterization of cross-reactive bell pepper allergens involved in the latex-fruit syndrome." *Clin Exp Allergy* **34** 1739-1746.
- Wan, L., Zha, W., Cheng, X., Liu, C., Lv, L., Wang, Z., y col. (2011). "A rice  $\beta$ -1,3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development." *Planta* **233** 309-323.
- Ward, E. R., Payne, G. B., Moyer, M. B., Williams, S. C., Dincher, S. S., Sharkey, K. C., y col. (1991). "Differential regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection." *Plant Physiol* **96** 390-397.
- Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee, R. y Welling-Wester, S. (1985). "Prediction of sequential antigenic regions in proteins." *FEBS Lett* **188** 4.
- Wetlaufer, D. B. (1962). "Ultraviolet spectra of proteins and amino acids." *Advances in Protein Chemistry* **17** 303-412.
- Willi, R., Pfab, F., Huss-Marp, J., Buters, J. T., Zilker, T., Behrendt, H., y col. (2009). "Contact anaphylaxis and protein contact dermatitis in a cook handling chicory leaves." *Contact Dermatitis* **60** 226-227.

- Williams, J., Roberts, H. y Tate, B. (2007). "Contact urticaria to olives." *Contact Dermatitis* **56** 52-53.
- Wojtkowiak, A., Witek, K., Hennig, J. y Jaskolski, M. (2012). "Two high-resolution structures of potato endo-1,3- $\beta$ -glucanase reveal subdomain flexibility with implications for substrate binding." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **68** 713-723.
- Wong, G. A. y King, C. M. (2004). "Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in pizza making." *Contact Dermatitis* **50** 102-103.
- Wopfner, N., Gadermaier, G., Egger, M., Asero, R., Ebner, C., Jahn-Schmid, B. y Ferreira, F. (2005). "The spectrum of allergens in ragweed and mugwort pollen." *Int Arch Allergy Immunol* **138** 337-346.
- Worrall, D., Hird, D. L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J. y Scott, R. (1992). "Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco." *Plant Cell* **4** 759-771.
- Yagami, T., Osuna, H., Kouno, M., Haishima, Y., Nakamura, A. y Ikezawa, Z. (2002). "Significance of carbohydrate epitopes in a latex allergen with  $\beta$ -1,3-glucanase activity." *Int Arch Allergy Immunol* **129** 27-37.
- Yasmin, N. y Saleem, M. (2013). "Biochemical characterization of fruit-specific pathogenesis-related antifungal protein from basrai banana." *Microbiol Res.*
- Yi, S. Y. y Hwang, B. K. (1997). "Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa beta-1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. glycines." *Mol Cells* **7** 408-413.
- Yip, L., Hickey, V., Wagner, B., Liss, G., Slater, J., Breiteneder, H., y col. (2000). "Skin prick test reactivity to recombinant latex allergens." *Int Arch Allergy Immunol* **121** 292-299.
- Yu, L., Niu, J. S., Ma, Z. Q., Chen, P. D. y Liu, D. J. (2003). "Cloning, mapping and protein expression of wheat thaumatin protein gene (TaTLP1)." *Yi Chuan Xue Bao* **30** 49-55.



- Yu, Z., Ying, X., Lin, T., Xiao-Lin, Q. y Fang, C. (2003). "Cloning and expression of a new Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare*)  $\beta$ -1,3-glucanase gene." Biotechnol Lett **25** 617-622.
- Yun, D. J., Zhao, Y., Pardo, J. M., Narasimhan, M. L., Damsz, B., Lee, H., y col. (1997). "Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94** 7082-7087.



# The Allergenic Structure of the Thaumatin-like Protein Ole e 13 Is Degraded by Processing of Raw Olive Fruits

M Torres,<sup>1</sup> E Alvarez-García,<sup>1</sup> J Bartra,<sup>2</sup> M Alcántara,<sup>3</sup> O Palomares,<sup>1</sup>  
M Villalba,<sup>1</sup> R Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Unitat d'Alèrgia Servei Pneumologia i Alèrgia Respiratòria, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Unidad de Alergología del Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain

## ■ Abstract

**Background:** The thaumatin-like protein (TLP) Ole e 13 in raw olive fruit is responsible for occupational allergy in olive oil mill workers. However, these workers do not experience allergic symptoms after ingestion of edible olive.

**Objectives:** To analyze the presence of IgE-reactive TLP in raw and edible olive fruit and to assess the allergenic potency of both sources.

**Methods:** The content of TLP in raw and edible olive fruit protein extracts was analyzed using immunoblotting with sera from allergic patients and with olive TLP-specific IgG. The structural and immunological stability of TLP were assayed using immunoblotting after treatment of both raw olive and purified TLP with 0.25 M NaOH solution for 24 hours. Olive pollen extract was investigated by immunoblotting for TLP content.

**Results:** The TLP contained in raw olive fruit was not present in edible olives as a result of maceration before human consumption. No TLP was detected in olive pollen using specific IgG or sera from patients allergic to olive fruit. Sera from patients allergic to olive pollen did not react with purified TLP.

**Conclusions:** IgE-reactive TLP is not present in edible olive, thus explaining the low number of patients allergic to this highly consumed fruit. Patients allergic to olive pollen are not sensitized to TLP and, therefore, are not expected to be at risk of food allergy to olive fruit or TLP plant sources.

**Key words:** *Olea europaea*. Olive fruit. Allergen. Thaumatin-like protein. Allergen.

## ■ Resumen

**Introducción:** La aceituna natural contiene una proteína de la familia de las taumatinas (TLP) que es responsable de la alergia ocupacional en trabajadores de molinos de aceite. Sin embargo, éstos no presentan síntomas cuando ingieren aceitunas comestibles.

**Objetivos:** Analizar la presencia de TLP en aceituna natural y comestible, y correlacionar sus niveles con la potencia alérgica de ambos productos.

**Métodos:** El contenido de TLP en los extractos proteicos de las aceitunas fue analizado por inmunotransferencia y tinción con sueros de pacientes alérgicos así como con antisuero específico para TLP de olivo. La estabilidad estructural e inmunológica de la TLP se ensayó mediante inmunotinción después del tratamiento del extracto de aceituna natural y de la TLP purificada con NaOH 0.25 M durante 24 h. También se analizó la presencia de TLP en el polen de olivo por inmunotinción.

**Resultados:** La TLP presente en la aceituna natural no se detecta en la comestible como consecuencia del tratamiento de maceración al que es sometida para obtener el producto apto para el consumo humano. No se observó TLP reactiva en el polen de olivo, ni con anticuerpos específicos ni con sueros de pacientes alérgicos a aceituna. Sueros de pacientes alérgicos al polen de olivo no reaccionan con la TLP purificada de aceituna.

**Conclusiones:** La TLP de olivo no está presente en las aceitunas comestibles lo que explica el escaso número de pacientes alérgicos a la aceituna. Además, los pacientes alérgicos al polen de olivo no están sensibilizados a TLP, por lo que no tendrían riesgo de sufrir alergia alimentaria a aceitunas o a fuentes vegetales de TLPs.

**Palabras clave:** *Olea europaea*. Aceituna. Taumatina. Alérgico.

## Introduction

The olive fruit is frequently consumed in Mediterranean countries as food, but it is also used as raw material to obtain olive oil, which has been demonstrated to prevent cardiovascular diseases, diabetes, and cancer [1,2]. Olive fruit derivatives are also used in cosmetic and health products. Allergies to olive fruit, olive oil, and derived products have been seldom reported despite widespread consumption of these products. Two cases of olive fruit allergy have been published. In the first, a 5-year-old boy experienced anaphylactic shock after eating olives [3], and in the second, a pizza chef experienced contact urticaria induced by olive fruit [4]. As for allergy to olive oil, most reported cases involve occupational allergy: patients, mainly cooks and masseurs, experienced contact eczema after overexposure to olive oil in the workplace [5-8]. The allergens were not identified in any of these cases. Olive pollen, on the other hand, frequently causes type I allergy [9,10] in countries where the olive tree (*Olea europaea*) is extensively cultivated, such as those of the Mediterranean coast, several areas of America (California, Chile, and Argentina), Australia, and South Africa. Thus, 12 allergens have been identified and characterized in olive pollen, and clinical significance varies for each, ranging from very high prevalence for Ole e 1 to very low prevalence for Ole e 8 [11,12]. Nevertheless, to date, none of these allergens have been reported in other olive tree tissues, including olive fruit.

Olive fruit was the material responsible for the occupational asthma experienced by an olive oil mill worker who was exposed daily to inhaled particles derived from the processing of olive fruit. However, the patient was asymptomatic when he ingested edible olives or inhaled pollen [13]. A putative thaumatin-like protein (TLP) from raw olive fruit extract was identified to be the elicitor of asthma in this case. TLPs have been reported to be food allergens in several fruits, such as apple, sweet cherry, pepper, kiwi, grape, peach, and banana, as well as in pollen from juniper, cypress, and cedar. The proteins of the TLP family are type 5 pathogenesis-related proteins, which defend plants against pathogens and consist of a panallergen family [14] whose members are involved in cross-reactivity processes [15]. Recently, TLP from wheat flour and from obeche dust were found to be responsible, respectively, for respiratory allergy in bakers [16] and occupational rhinitis and asthma in carpenters [17].

In this study, we searched for differences in the content and integrity of TLP in raw and edible olive fruit in order to explain the minor allergenic activity of the latter. We found that the exhaustive maceration of raw olives before they can be considered suitable for human consumption results in degradation of the TLP. Therefore, the IgE reactivity of olive TLP is abolished during processing. We analyzed the IgE reactivity to raw and edible olive fruit of patients sensitized through inhalation or ingestion. The presence of TLP in pollen was also analyzed, and the results discussed to determine the implication of this protein in the potential sensitivity of olive pollen-allergic patients.

## Methods

### Sera and Antibodies

Patients included in this study were recruited from the Complejo Hospitalario de Jaén, Jaén, Spain (n=1, patient J; and a pool of 10 sera from patients allergic to olive pollen) and Hospital Clínic, Barcelona, Spain (n=2, patients B1 and B2). Patient J (age 41) had a clinical history of occupational allergy to the flour of olive fruit when the olive oil mill was operating; the results of skin prick tests with purified TLP from olive fruit outside the harvesting period were positive at 1 µg/mL (9 mm<sup>2</sup>) [13]. Testing was also performed with the pool of sera from 10 patients, who had a radioallergosorbent test score >3 to olive pollen extract, seasonal rhinitis and/or bronchial asthma from late April to June, and a positive skin prick test result with *O. europaea* pollen extract (ALK-Abelló). Patient B1 (age 27; total IgE, 54.10 kU<sub>A</sub>/L) experienced anaphylaxis to peach and hazelnut and had a positive prick test result to peach peel, apple, hazelnut, kiwi, lettuce, mustard, and corn; he was sensitized to *Artemisia* and *Salsola* pollen and had rhinoconjunctivitis to *Platanus acerifolia*. Patient B2 (age 20; total IgE, 95.40 kU<sub>A</sub>/L) experienced anaphylactic shock after ingestion of nuts and had positive prick test results to mites, hazelnut, peach peel, and mustard; he was sensitized to *Parietaria* and *P. acerifolia*. Patients B1 and B2 had anaphylaxis after ingesting olive fruit and positive prick-prick results to olive fruit (7 × 7 mm and 6 × 5 mm, respectively). Neither was sensitized to olive pollen. Written informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committees of Universidad Complutense (Madrid, Spain), Complejo Hospitalario de Jaén (Jaén, Spain), and Hospital Clínic (Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

Polyclonal antiserum against olive TLP was obtained by weekly intraperitoneal injections of BALBc mice with 1 µg of the purified allergen preincubated for 1 hour with Al(OH)<sub>3</sub>. After 35 days of treatment, serum was obtained by centrifugation of the blood [18].

### Olive Fruit and Pollen Extracts

Edible and raw olives were obtained, respectively, from a local food store and from an olive cultivar (both were *Olea europaea*, var. manzanilla). Olive pulp was manually removed from the pits, cut into pieces, and lyophilized. The material obtained was pulverized by grinding in a mortar in liquid air. The resulting powder was extracted 3 times with 4% (wt/vol) ether/ethanol (3:1). The pellet was air-dried, suspended in 5% phosphate-buffered saline (pH 7.0), and gently stirred for 1 hour. The supernatant was separated by centrifugation at 10 000 rpm for 30 minutes and dialyzed against 50 mM of ammonium bicarbonate (pH 8.0) for 16 hours. All the steps were performed at 4°C. Supernatants were lyophilized and stored at -20°C.

Protein extract from olive tree pollen was prepared as previously described [19], with minor modifications.

### Purification of Thaumatin-Like Protein From Olive Fruit Pulp

Lyophilized olive pulp extract was dissolved in 0.2 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) applied onto a Sephadex

G-50 column, and eluted with the same buffer. The fractions were tested for protein by staining of SDS-PAGE gels with Coomassie Brilliant Blue R-250 and for IgE reactivity with the serum of the patient with occupational asthma using Western blot on nitrocellulose membranes. Those fractions containing the IgE-reactive protein were pooled, lyophilized, and further resolved on a reverse-phase Nucleosil C-18 HPLC column eluted with a gradient (0-60%) of acetonitrile in 0.1% trifluoroacetic acid. Fractions with IgE reactivity were lyophilized and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### Analytical Procedures

SDS-PAGE was performed in 15% (wt/vol) polyacrylamide gels either under reducing conditions (in the presence of 2-mercaptoethanol [2-ME]) or under nonreducing conditions. Proteins were visualized using Coomassie Brilliant Blue R-250 or transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). Protein concentration was determined using the Lowry assay [20].

### IgE and IgG Immunoblot Analyses

Purified TLPs from olive fruit (1  $\mu\text{g}$  per strip), olive pollen extract (40  $\mu\text{g}$  of total protein per strip), or olive fruit pulp extracts (200  $\mu\text{g}$ ) were separated using SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions and blotted onto nitrocellulose membranes. Samples of pulp extracts from raw and edible olives (10  $\mu\text{g}$  of total protein) were also assayed by dot blot. After incubation with blocking buffer, the membranes were probed with patients' sera (diluted 1:10). Bound IgE antibodies were detected by incubating first with mouse antihuman IgE monoclonal antibodies (diluted 1:5000; kindly donated by ALK-Abelló) and then with horseradish peroxidase-coupled goat antimouse IgG (diluted 1:2500; Pierce Chemical Co) [21]. The peroxidase reaction was developed using the ECL Western blot reagent (Amersham Biosciences) [22] and detected in an LAS3000 luminescent image analyzer (Fujifilm Life Sciences). Quantification was performed in triplicate using the computer program Multigauge V3.0.

IgG reactivity of purified protein or protein extracts was assayed with specific pAb obtained against purified olive TLP (diluted 1:500) and detected by horseradish peroxidase-labelled goat antimouse IgG (diluted 1:3000) as previously described [18]. The signal was developed and quantified (see above).

### Preparation of Edible Olive Fruit

Raw olive fruit was immersed in 0.25 M of NaOH for 24 hours at room temperature, washed with distilled water, and left for 2 hours; washing was repeated at least twice. In most commercial procedures, this treatment is completed by adding spices (eg, oregano, thyme, rosemary, fennel, and bay leaf) or dressings to obtain different flavors. We avoided these products when treating the raw olive fruits, although they are generally used in the commercial olives obtained from food stores. Protein was then extracted for raw and edible olive fruit (see above).

Purified olive TLP underwent the same treatment.

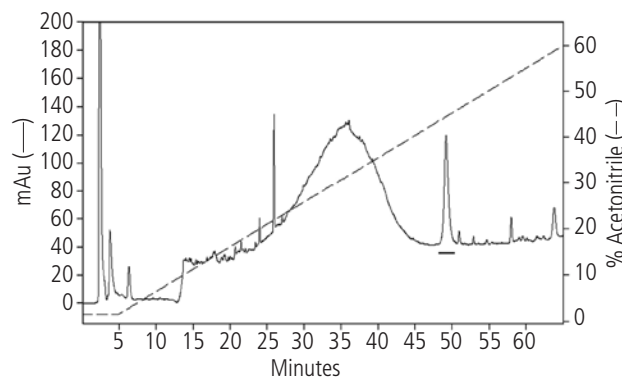


**Figure 1.** Comparison of raw olive (A) and edible olive (B) protein extracts (200  $\mu\text{g}$  per lane) after separation by SDS-PAGE and staining with CBS or transfer to membranes and immunostaining with sera J, B1, and B2, in the absence (–) and in the presence (+) of 2-ME. Molecular weight markers are indicated in kDa. Immunostaining of the same samples (10  $\mu\text{g}$  of total protein) by dot blot are shown at the bottom of the figure. CBS indicates Coomassie Brilliant Blue R-250; ME, 2-mercaptoethanol.

## Results

### TLP is Absent From Edible Olive Fruit

Protein extracts from raw and edible olive fruit were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Figure 1). A 23-kDa protein band was detected in raw olive fruit under nonreducing conditions; this value increased to 27 kDa after treatment with 2-ME. The same bands were detected when the samples were transferred to nitrocellulose membranes and immunostained with the IgE antibodies of serum J, which belonged to the oil mill worker, indicating that the protein maintained IgE reactivity under reducing conditions. However, a faint signal (28% of the signal for serum J) was detected by the serum from patient B1, who was allergic to edible olive. The IgE-reactive protein corresponded to olive TLP, as previously described [13]. The

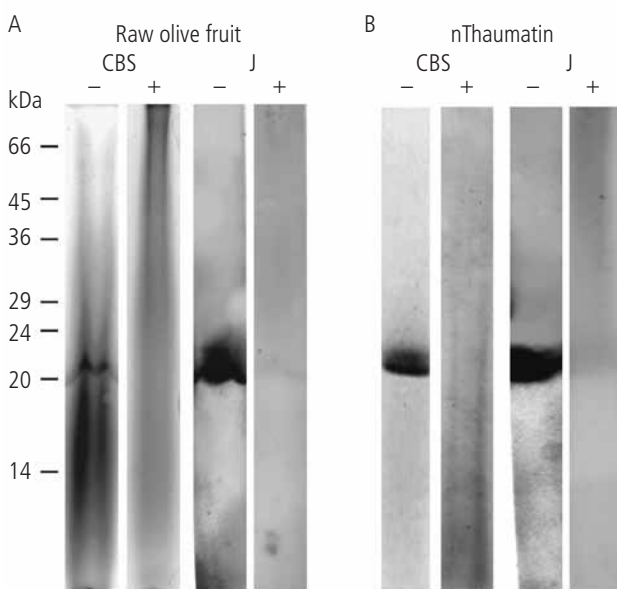


**Figure 2.** Last step of purification of TLP from raw olive fruit. Elution profile on a reverse-phase Nucleosil C18 HPLC column using an acetonitrile gradient in 0.1% trifluoroacetic acid. The horizontal bar indicates the TLP position in the elution profile.

results obtained by performing the assays by dot blot essentially agree with those obtained in SDS-PAGE. Furthermore, all traces of defined protein bands disappeared in the SDS-PAGE of protein extracts obtained from edible olive, and no IgE reactivity was detected for any sera. In the corresponding dot blot experiments, IgE reactivity was found for the 3 sera. Remarkably, sera B1 and B2 only reacted against edible olive in dot blot but not in immunoblotting, suggesting that low-molecular-weight IgE-reactive products added during the maceration of raw olives or remaining TLP-derived peptides could be present in edible olives.

#### **Treatment With NaOH of TLP From Olives and Raw Olives: IgE Reactivity of the Products**

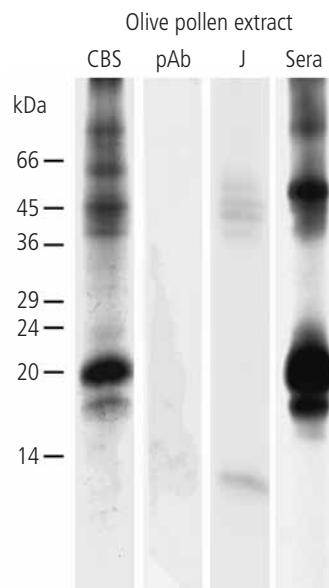
The IgE-reactive protein was purified in 2 chromatographic steps, namely, size-exclusion chromatography in Sephadex G-50 and reverse-phase C-18 HPLC (Figure 2), which enabled removal of the high amount of pigments that were responsible for smearing in SDS-PAGE. The protein eluted at 53% of acetonitrile was identified as the IgE-reactive material Ole e 13. The purified protein was dissolved in 0.25 M NaOH, and raw olives were macerated in the same solvent. After 24 hours, the protein was dialyzed, and the olive was exhaustively rinsed in distilled water. Protein extract from olive fruit treated with NaOH was prepared for raw olive (see above) and lyophilized until use. Both samples underwent SDS-PAGE and were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 or transferred to membranes and immunostained with serum J (Figure 3). IgE reactivity disappeared in the samples treated with NaOH.



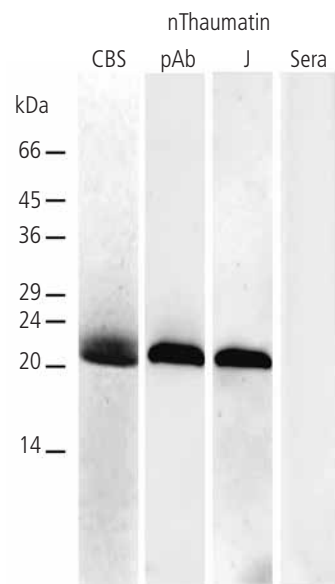
**Figure 3.** Treatment of raw olive fruit (A) and purified thaumatin (B) with NaOH. Staining with CBS and immunostaining with serum J after SDS-PAGE separation of the products obtained with (+) or without (–) NaOH. Molecular weight markers are indicated. CBS indicates Coomassie Brilliant Blue R-250.

#### **Analysis of the Presence of TLP in Olive Tree Pollen**

Immunoblot experiments were performed to investigate the presence of olive TLP in olive tree pollen. IgE antibodies from serum J directed to TLP from olive fruit did not react to olive pollen extract (Figure 4). In addition, specific polyclonal antibody to olive fruit TLP did not recognize any proteins in the pollen



**Figure 4.** Western blot of olive pollen protein extract (40 µg total protein) with specific IgG and IgE antibodies to thaumatin-like protein. Pollen extract stained with CBS and immunostained with polyclonal antibody specific to olive thaumatin-like protein, or with serum J, and with a pool of sera from patients allergic to olive pollen. Molecular weight markers are shown. CBS indicates Coomassie Brilliant Blue R-250; pAb, polyclonal antibody.



**Figure 5.** Assay of IgE reactivity of olive pollen allergic patients (lane Sera) to purified thaumatin (1 µg) in comparison to the reactivity of a specific polyclonal antibody and serum J. Molecular weight markers are shown. CBS indicates Coomassie Brilliant Blue R-250; pAb, polyclonal antibody.



extract. For comparison, olive pollen extract was immunostained with a pool of sera from olive pollen-allergic patients, and a positive response was observed for several proteins.

### *IgE Reactivity to Olive TLP of Sera From Olive Pollen-Allergic Patients*

Purified olive TLP was analyzed to determine IgE reactivity against the same pool of sera from olive pollen-allergic patients, in comparison with the specific polyclonal antibody and serum J. The result of the immunoblotting assay was negative for the IgE reactivity of the sera from olive pollen-allergic patients (Figure 5), thus showing that TLP is not an allergen in this group.

## Discussion

Olive fruit is widely consumed in Mediterranean countries. However, allergy to ingested olive fruit has received little attention in the literature [3]. Only a few cases of atopic dermatitis have been attributed to handling of this food or its oil [4-8]. Olive fruit allergen was not identified until 2008, when *in vivo* and *in vitro* analyses revealed a TLP to be responsible for bronchial and nasal allergic symptoms that an oil mill worker experienced in the work place because of daily exposure to flours derived from ground olive fruits [13]. The causative allergen was found in the protein extract obtained from the raw olive fruit and is the only allergen identified to date. The lack of association between high consumption of olive and the very low prevalence of allergy to this fruit prompted us to explore differences in TLP protein content between raw and edible sources. Our results could provide the first explanation for the scarce number of patients allergic to edible olives, even though the food is widely consumed in Mediterranean countries and in other countries (albeit to a lesser extent). In addition, the observation that patients who are allergic to olive pollen do not show hypersensitivity to olive fruit could be explained by the absence of TLP in pollen.

TLP from raw olive fruit was well recognized by serum from patient J and did not lose IgE reactivity when treated with a reagent disrupting disulphide bridges, which are abundant in the native structure of TLP. However, sera from patients B1 and B2 (sensitive to edible olive fruit by ingestion) only reacted with TLP from the raw material under reducing conditions, and the intensity of IgE reactivity was very low. When the same assay was performed with commercial edible olives, no signal was detected under any conditions. This difference in the reaction of the patient's serum to TLP could be due to the route of access of the olive fruit, since it behaved as an aeroallergen for patient J but not for patients B1 and B2, who had a long history of food allergy. Many of the plant foods to which patients B1 and B2 were hypersensitive contained allergenic TLP. Therefore, the faint IgE reactivity observed against the 2-ME-treated raw olives (Figure 1A) could be explained by residual cross-reactivity between the members of this protein family, because reducing conditions could lead to exposure of the peptides responsible for traces of reactivity.

The IgE reactivity for any of the protein components present in the SDS-PAGE was lost for all the sera with the

edible material, indicating that no TLP was present in the samples. The result of the dot blot assay with edible samples was positive, both in the absence and in the presence of 2-ME. There could be 2 possible explanations for this observation: (a) the existence in the sample of small but IgE-reactive peptides derived from protein components of the olive fruit disrupted by processing with NaOH to make olive fruits edible; or (b) nonprotein molecules derived from the condiments (mainly spices) added to the olive preparations in order to flavor the edible commercial products. Glycosylation cannot be involved in the positive reaction of the dot blot, since olive thaumatin is not glycosylated. Furthermore, patients B1 and B2 could be sensitive to lipophilic proteins removed during delipidation of the protein extract, thus supporting their clinical data.

The protein content of olive fruit is 1.3% to 1.8% of the dry weight, irrespective of the variety of fruit and stage of ripening [23]. TLP is the major protein component of the soluble saline protein extract of olive fruit after delipidation of the ground pulp, as deduced from staining with Coomassie Brilliant Blue R-250, in which no other defined protein bands were detected (Figure 1A). This result was consistent with those of our previous report [13] and with those of a recent study of olive pulp proteins in which SDS-PAGE revealed a major band of 24 kDa [24]. TLP from raw olive was purified by reverse-phase HPLC eluting at a high concentration of the organic solvent (Figure 2). Such a finding points to the stability of the protein in the raw olive fruit and a high lipid content. Treatment of olive fruit to remove oleuropein, which is the phenolic glycoside component that gives raw olive its bitter, pungent taste, requires the raw material to be maintained in an NaOH solution for 24-36 hours. This procedure was carried out with olive fruit and with purified TLP. In both cases, the protein and IgE reactivity disappeared from the samples. TLP are antifungal proteins of approximately 23 kDa that belong to type 5 pathogenesis-related proteins [14]. These proteins are generally resistant to proteolysis and denaturation by heat or changes in pH [25]. However, prolonged treatment with NaOH led to disruption of the protein (probably by hydrolysis) and loss of IgE recognition. This result is consistent with the lack of detection of TLP in edible olives and supports the scarce allergenicity of edible olives.

It is not unusual for crushed plant foods to cause allergy by inhalation. Soy seed powder and cereal flours are responsible for asthma in hypersensitive patients and are frequently involved in occupational allergy in individuals who handle ground foods (eg, baker's asthma). The allergens identified in these seeds are mainly members of the prolamin superfamily and include 2S albumins and  $\alpha$ -amylase inhibitors. TLPs were recently reported to be involved in occupational allergy in bakers and carpenters caused by wheat flour and obeche dust [16,17]. TLP from olive fruit is a new finding and should be taken into account in the diagnosis of allergy to *O. europaea*. Nevertheless, TLP cannot be a significant allergen from olive pollen, which is a typical source of aeroallergens, since TLP epitopes were detected neither by specific IgG nor by sera from olive pollen-allergic patients with high IgE titers. Therefore, the large number of patients who are hypersensitive to olive pollen in areas of intensive cultivation of olive trees do not seem to be at risk of allergy to olive fruit or other plant sources of TLPs.

The TLPs described as allergenic components of plant foods include Mal d 2 from apple [26], Act d 2 from kiwi [27], Pru av 2 from sweet cherry [28], Pru p 2 from peach [29], and Mus a 4 from banana [30]. Major allergens of *Cupressus arizonica* and *Juniperus ashei* pollen have also been detected [31,32]. Putative IgE cross-reactivity of these allergens with olive TLP remains to be analyzed and requires in-depth study. The data we present indicate that patients who are allergic to TLP from plant foods might not be sensitive to edible olives through this family of proteins.

Finally, since TLP seems to be the main protein component of olives—and thus is potentially present in olive oil—we can speculate that it could also be involved in allergy to cosmetic or health products containing olive-derived materials, both by contact and through ingestion. Olive-derived materials are increasingly used in the manufacture of cosmetic and health products and should be taken into consideration when performing clinical.

## Acknowledgments

We thank Gabriel Pereira for technical support.

## Funding

This work was supported by grants SAF2008-04053 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and RD07/0064/0009 from FIS (Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo).

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med*. 2007;44:335-40.
- Pérez-Jiménez F, Lista JD, Pérez-Martínez P, López-Segura F, Fuentes F, Cortés B, Lozano A, Lopez-Miranda J. Olive oil and haemostasis: a review on its healthy effects. *Public Health Nutr*. 2006;9:1083-8.
- Enríquez-Matas A, Escudero C, Lombardero M, Ibáñez-Sandín M, Calderón S, Muñoz C, Laso T. Anaphylactic shock due to olive fruits. *Allergy*. 2007;62:Suppl.83.
- Williams J, Roberts H, Tate B. Contact urticaria to olives. *Contact Dermatitis*. 2007;56:52-3.
- de Boer EM, van Ketel WG. Contact allergy to an olive oil containing ointment. *Contact Dermatitis*. 1984;11:128-9.
- Malmkvist-Padoan S, Pettersson A, Svensson A. Olive oil as a cause of contact allergy in patients with venous eczema, and occupationally. *Contact Dermatitis*. 1990;23:73-76.
- Isaksson M, Bruze M. Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in a masseur. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41:312-5.
- Wong GA, King CM. Occupational allergic contact dermatitis from olive oil in pizza making. *Contact Dermatitis*. 2004;50:102-3.
- Liccardi G, D'Amato M, D'Amato G. Oleaceae pollinosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 1996;111:210-7.
- Jason F, White MD, Bernstein DI. Key pollen allergens in North America. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003;91:425-35.
- Rodríguez R, Villalba M, Monsalve RI, Batanero E. The spectrum of olive pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2001;125:185-95.
- Batanero E, Rodríguez R, Villalba M. Olive Pollen Allergens: an insight into clinical, diagnostic and therapeutic concepts of allergy. In: Preedy VR and Watson RR. *Olives and olive oil in health and disease prevention*. Academic Press; 2010; p. 1021-31.
- Palomares O, Alcántara M, Quiralte J, Villalba M, Garzón F, Rodríguez R. A thaumatin-like protein and occupational airway disease in an olive-oil mill worker. *New Engl J Med*. 2008;358:1306-8.
- Breiteneder H. Thaumatin-like proteins – a new family of pollen and fruit allergens. *Allergy*. 2004;59:479-81.
- Palacín A, Rivas LA, Gómez-Casado C, Aguirre J, Tordesillas L, Bartra J, Blanco C, Carrillo T, Cuesta-Herranz J, Cumplido Bonny JA, Flores E, García-Alvarez-Eire MG, García-Núñez I, Fernández FJ, Gamboa P, Muñoz R, Sánchez-Monge R, Torres M, Varela Losada S, Villalba M, Vega F, Parro V, Blanca M, Salcedo G, Díaz-Perales A. The involvement of thaumatin-like proteins in plant food cross-reactivity: a multicenter study using a specific protein microarray. *PLoS One*. 2012;7:Issue 9, e44088.
- Lehto M, Airaksinen L, Puustinen A, Tillander S, Hannula S, Nyman T, Toskala E, Alenius H, Lauerma A. Thaumatin-like protein and baker's respiratory allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2010;104:139-46.
- Aranda A, Campo P, Palacín A, Doña I, Gomez-Casado C, Galindo L, Díaz-Perales A, Blanca M. Antigenic proteins involved in occupational rhinitis and asthma caused by obeche wood (*Triplochiton scleroxylon*). *PlosOne*. 2013;8:Issue1:e53926. doi: 10.1371/journal.pone.0053926.
- Sirvent S, Tordesillas L, Villalba M, Díaz-Perales A, Cuesta-Herranz J, Salcedo G, Rodríguez R. Pollen and plant food profilin allergens show equivalent IgE reactivity. *Ann Allergy Asth Immunol*. 2011;106:429-35.
- Villalba M, López-Otín C, Martín-Orozco E, Monsalve RI, Palomino P, Lahoz C, Rodríguez R. Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europea* pollen and N-terminal amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;172:523-8.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-75.
- Sirvent S, Palomares O, Vereda A, Villalba M, Cuesta-Herranz J, Rodríguez R. nsLTP and profilin are allergens in mustard seeds: cloning, sequencing and recombinant production of Sin a 3 and Sin a 4. *Clin Exp Allergy*. 2009;39:1929-36.
- Palomares O, Vereda A, Cuesta-Herranz J, Villalba M, Rodríguez R. Cloning, sequencing, and recombinant production of Sin a 2, an allergenic 11S globulin from yellow mustard seeds. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;119:1189-96.
- Zamora R, Alaiz M, Hidalgo FJ. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J Agric Food Chem*. 2001;49:4267-70.



24. Esteve C, Del Río C, Marina ML, García MC. Development of an ultra-high performance liquid chromatography analytical methodology for the profiling of olive (*Olea europaea* L.) pulp proteins. *Anal Chim Acta*. 2011;690:129-34.
25. Smole U, Bublin M, Radauer C, Ebner C, Breiteneder H. Mal d 2, the thaumatin-like allergen from apple, is highly resistant to gastrointestinal digestion and thermal processing. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;147:289-98.
26. Hsieh L-S, Moos Jr M, Lin Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;96:960-70.
27. Gavrović -Jankulović M, Ćirković T, Vučković O, Atanasković-Marković M, Petersen A, Gojgić G, Burazer L, Jankov RM. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110:805-10.
28. Fuchs HC, Bohle B, Dall'Antonia Y, Radauer C, Hoffmann-Sommergruber K, Mari A, Scheiner O, Keller W, Breiteneder H. Natural and recombinant molecules of the cherry allergen Pru av 2 show diverse structural and B cell characteristics but similar T cell reactivity. *Clin Exp Allergy*. 2006;36:359-68.
29. Palacín A, Tordesillas L, Gamboa P, Sánchez-Monge R, Cuesta-Herranz J, Sanz ML, Barber D, Salcedo G, Díaz-Perales A. Characterization of peach thaumatin-like proteins and their identification as major peach allergens. *Clin Exp Allergy*. 2010;40:1422-30.
30. Palacín A, Quirce S, Sánchez-Monge R, Bobolea I, Díaz-Perales A, Martín-Muñoz F, Pascual C, Salcedo G. Sensitization profiles to purified plant food allergens among pediatric patients with allergy to banana. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011;22:186-95.
31. Cortegano I, Civantos E, Aceituno E, del Moral A, López E, Lombardero M, del Pozo V, Lahoz C. Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment. *Allergy*. 2004;59:485-90.
32. Fujimura T, Futamura N, Midoro-Horiuti T, Togawa A, Goldblum RM, Yasueda H, Saito A, Shinohara K, Masuda K, Kurata K, Sakaguchi M. Isolation and characterization of native Cry j 3 from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *Allergy*. 2007;62:547-53.

■ *Manuscript received May 6, 2013; accepted for publication July 16, 2013.*

■ **Rosalía Rodríguez**

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I  
Facultad de Química  
Universidad Complutense de Madrid  
28040 Madrid, Spain  
E-mail: rrg@bbm1.ucm.es